

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7686574号

(P7686574)

(45)発行日 令和7年6月2日(2025.6.2)

(24)登録日 令和7年5月23日(2025.5.23)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

Z N A

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

請求項の数 14 (全215頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-569894(P2021-569894)

(86)(22)出願日 令和2年5月22日(2020.5.22)

(65)公表番号 特表2022-533796(P2022-533796
A)

(43)公表日 令和4年7月25日(2022.7.25)

(86)国際出願番号 PCT/US2020/034418

(87)国際公開番号 WO2020/237227

(87)国際公開日 令和2年11月26日(2020.11.26)

審査請求日 令和5年5月18日(2023.5.18)

(31)優先権主張番号 62/851,548

(32)優先日 令和1年5月22日(2019.5.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/857,121

(32)優先日 令和1年6月4日(2019.6.4)

最終頁に続く

(73)特許権者 596060697

マサチューセッツ インスティテュート

オブ テクノロジー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02

139ケンブリッジ, マサチューセッツ

・アヴェニュー・77

(73)特許権者 522223741

オルナ セラピューティクス インコーポ

レイテッド

アメリカ合衆国 02472 マサチュー

セッツ州 ウォータータウン フォージ

ロード 500

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100205707

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 環状RNA組成物及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

a. スプライシング後3'グループイントロンフラグメントと、内部リボソーム侵入部位(IRES)と、キメラ抗原受容体(CAR)またはT細胞受容体(TCR)複合体タンパク質をコードする発現配列と、スプライシング後5'グループイントロンフラグメントとを含む、環状RNAポリヌクレオチド、ならびに

b. (i) イオン化可能脂質、(ii) 構造脂質、及び(iii) PEG修飾脂質を含む、輸送ビヒクル

を含む、医薬組成物であって、

前記輸送ビヒクルが、前記環状RNAポリヌクレオチドを、ヒト対象に存在するヒト免疫細胞に送達することができ、その結果、前記CARまたはTCRが前記ヒト免疫細胞において翻訳され、前記ヒト免疫細胞の表面上で発現される、前記医薬組成物。

【請求項2】

前記IRESが、タウラ症候群ウイルス、トリアトーマウイルス、タイラー脳脊髄炎ウイルス、シミアンウイルス40、ヒアリ(Solenopsis invicta)ウイルス1、ムギクビレアブラムシ(Rhopalosiphum padi)ウイルス、細網内皮症ウイルス、ヒトポリオウイルス1、チャバネアオカメムシ(Plautia stali)腸ウイルス、カシミールハチウイルス、ヒトライノウイルス2、ホマロディスカ・コアギュラタ(Homalodiscia coagulata)ウイルス-1、ヒト

免疫不全ウイルス1型、ホマロディスカ・コアギュラタウイルスー1、ヒメトビPウイルス、C型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス、GB型肝炎ウイルス、口蹄疫ウイルス、ヒトエンテロウイルス71、ウマ鼻炎ウイルス、ウスジロエダシャク (*Ectropis obliqua*) ピコルナ様ウイルス、脳心筋炎ウイルス、ショウジョウバエCウイルス、ヒトコクサッキーウイルスB3、アブラナ科トバモウイルス、クリケット麻痺ウイルス、ウシウイルス性下痢ウイルス1、ブラッククイーンセルウイルス、アブラムシ致死麻痺ウイルス、トリ脳脊髄炎ウイルス、急性ミツバチ麻痺ウイルス、ハイビスカスクロロティックリングスポットウイルス、古典的ブタ熱ウイルス、ヒトFGF2、ヒトSFTPA1、ヒトAML1/RUNX1、ショウジョウバエアンテナペディア、ヒトAQP4、ヒトAT1R、ヒトBAG-1、ヒトBCL2、ヒトBiP、ヒトc-IAP1、ヒトc-myc、ヒトeIF4G、マウスNDST4L、ヒトLEF1、マウスHIF1アルファ、ヒトn.myc、マウスGtx、ヒトp27kip1、ヒトPDGF2/c-sis、ヒトp53、ヒトPim-1、マウスRbm3、ショウジョウバエreaper、イヌScamper、ショウジョウバエUbx、ヒトUNR、マウスUtrA、ヒトVEGF-A、ヒトXIAP、ショウジョウバエhairless、S.セレビスエ (*S. cerevisiae*) TFIID、S.セレビスエYAP1、タバコエッチウイルス、カブクリンクルウイルス、EMCV-A、EMCV-B、EMCV-Bf、EMCV-Cf、EMCVpEC9、ピコビルナウイルス、HCV QC64、ヒトコサウイルスE/D、ヒトコサウイルスF、ヒトコサウイルスJMY、ライノウイルスNAT001、HRV14、HRV89、HRVC-02、HRV-A21、サリウイルスA SH1、サリウイルスFHB、サリウイルスNG-J1、ヒトパレコウイルス1、クロヒウイルスB、Yc-3、ロサウイルスM-7、シャンバウイルスA、パシウイルスA、パシウイルスA 2、エコーウイルスE14、ヒトパレコウイルス5、アイチウイルス、A型肝炎ウイルスHA16、フォピウイルス、CVA10、エンテロウイルスC、エンテロウイルスD、エンテロウイルスJ、ヒトペギウイルス2、GBV-C GT110、GBV-C K1737、GBV-C Iowa、ペギウイルスA 1220、パシウイルスA 3、サペロウイルス、ロサウイルスB、バクンサ (*Bakunsa*) ウイルス、トレモウイルスA、ブタパシウイルス1、PLV-CHN、パシウイルスA、シニウイルス、ヘパシウイルスK、ヘパシウイルスA、BVDV1、ボーダー病ウイルス、BVDV2、CSFV-PK15C、SF573ジシストロウイルス、湖北ピコルナ様ウイルス、CRPV、サリウイルスA BN5、サリウイルスA BN2、サリウイルスA 02394、サリウイルスA GUT、サリウイルスA CH、サリウイルスA SZ1、サリウイルスFHB、CVB3、CVB1、エコーウイルス7、CVB5、EVA71、CVA3、CVA12、EV24、またはeIF4Gに対するアプタマーに由来する、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

第1の内部スペーサーを、前記スプライシング後3' グループイントロンフラグメントと前記IRESとの間に、及び

第2の内部スペーサーを、前記発現配列と前記スプライシング後5' グループイントロンフラグメントとの間に

含む、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記第1及び第2の内部スペーサーがそれぞれ、10～60ヌクレオチドの長さを有する、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記輸送ビヒクルが、脂質ナノ粒子、コアシェルナノ粒子、生分解性ナノ粒子、生分解性脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、または生分解性ポリマーナノ粒子を含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項6】

標的化部分をさらに含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項7】

10

20

30

40

50

前記ヒト対象においてがんを処置するのに有効な量の、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記組成物内の前記ポリヌクレオチドの 1 重量%未満が、二本鎖 RNA、DNA スプリント、または三リン酸化 RNA である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記輸送ビヒクルが、1 つより多い環状 RNA ポリヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

免疫細胞の集団を作製するエキスピボの方法であって、

スプライシング後 3' グループエイントロンフラグメントと、IRES と、CAR または TCR 複合体タンパク質をコードする発現配列と、スプライシング後 5' グループエイントロンフラグメントとを含む環状 RNA ポリヌクレオチドを含む輸送ビヒクルを、前記集団内の細胞と接触させる工程を含み、

前記輸送ビヒクルが、(i) イオン化可能脂質、(ii) 構造脂質、及び (iii) PEG 修飾脂質を含み、

前記輸送ビヒクルが、前記環状 RNA ポリヌクレオチドをヒト免疫細胞にエキスピボで送達することができ、その結果、前記 CAR または TCR が前記ヒト免疫細胞において翻訳され、前記ヒト免疫細胞の表面上で発現される、

前記方法。

【請求項 11】

がんの処置のための医薬の製造における医薬組成物の使用であって、前記医薬組成物が、

a. スプライシング後 3' グループエイントロンフラグメントと、IRES と、CAR または TCR 複合体タンパク質をコードする発現配列と、スプライシング後 5' グループエイントロンフラグメントとを含む、環状 RNA ポリヌクレオチド、ならびに

b. (i) イオン化可能脂質、(ii) 構造脂質、及び (iii) PEG 修飾脂質を含む、輸送ビヒクルを含み、

前記輸送ビヒクルが、前記環状 RNA ポリヌクレオチドをヒト免疫細胞に送達することができ、その結果、前記 CAR または TCR が前記ヒト免疫細胞において翻訳され、前記ヒト免疫細胞の表面上で発現される、

前記使用。

【請求項 12】

前記がんが、急性リンパ球性癌；急性骨髄性白血病（AML）；肺胞横紋筋肉腫；膀胱癌；骨癌；脳癌；乳癌；肛門、肛門管、または肛門直腸のがん；眼のがん；肝内胆管のがん；関節のがん；首、胆嚢、または胸膜のがん；鼻、鼻腔、または中耳のがん；口腔のがん；外陰部のがん；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性癌；結腸癌；食道癌；子宮頸癌；線維肉腫；消化管カルチノイド腫瘍；頭頸部癌；ホジキンリンパ腫；下咽頭癌；腎臓癌；喉頭癌；白血病；液性腫瘍；肝臓癌；肺癌；リンパ腫；中皮腫；肥満細胞腫；黒色腫；多発性骨髄腫；上咽頭癌；非ホジキンリンパ腫；B-慢性リンパ球性白血病；有毛細胞白血病；急性リンパ球性白血病（ALL）；及びバーキットリンパ腫；卵巣癌；膵臓癌；腹膜、大網、及び腸間膜の癌；咽頭癌；前立腺癌；直腸癌；腎癌；皮膚癌；小腸癌；軟部組織癌；固形腫瘍；滑膜肉腫；胃癌；精巣癌；甲状腺癌；ならびに尿管癌からなる群より選択される、請求項 11 に記載の使用。

【請求項 13】

がんの処置における使用のための医薬組成物であって、前記医薬組成物が、

a. スプライシング後 3' グループエイントロンフラグメントと、IRES と、CAR または TCR 複合体タンパク質をコードする発現配列と、スプライシング後 5' グループエイントロンフラグメントとを含む、環状 RNA ポリヌクレオチド、ならびに

b. (i) イオン化可能脂質、(ii) 構造脂質、及び (iii) PEG 修飾脂質を含む、輸送ビヒクルを含み、

前記輸送ビヒクルが、前記環状 RNA ポリヌクレオチドをヒト免疫細胞に送達すること

10

20

30

40

50

ができ、その結果、前記CARまたはTCRが前記ヒト免疫細胞において翻訳され、前記ヒト免疫細胞の表面上で発現される、前記医薬組成物。

【請求項14】

前記がんが、急性リンパ球性癌；急性骨髄性白血病（AML）；肺胞横紋筋肉腫；膀胱癌；骨癌；脳癌；乳癌；肛門、肛門管、または肛門直腸のがん；眼のがん；肝内胆管のがん；関節のがん；首、胆嚢、または胸膜のがん；鼻、鼻腔、または中耳のがん；口腔のがん；外陰部のがん；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性癌；結腸癌；食道癌；子宮頸癌；線維肉腫；消化管カルチノイド腫瘍；頭頸部癌；ホジキンリンパ腫；下咽頭癌；腎臓癌；喉頭癌；白血病；液性腫瘍；肝臓癌；肺癌；リンパ腫；中皮腫；肥満細胞腫；黒色腫；多発性骨髄腫；上咽頭癌；非ホジキンリンパ腫；B-慢性リンパ球性白血病；有毛細胞白血病；急性リンパ球性白血病（ALL）；及びバーキットリンパ腫；卵巣癌；脾臓癌；腹膜、大網、及び腸間膜の癌；咽頭癌；前立腺癌；直腸癌；腎癌；皮膚癌；小腸癌；軟部組織癌；固形腫瘍；滑膜肉腫；胃癌；精巣癌；甲状腺癌；ならびに尿管癌からなる群より選択される、請求項13に記載の医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この出願は、2019年5月22日に出願された米国仮特許出願第62/851,548号；2019年6月4日に出願された米国仮特許出願第62/857,121号；2019年6月5日に出願された国際特許出願番号PCT/US2019/035531、2019年12月4日に出願された米国仮特許出願第62/943,796号；2019年12月4日に出願された米国仮特許出願第62/943,779号；及び2020年2月10日に出願された米国仮特許出願第62/972,194号（これらの開示は全ての目的に関して参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）の利益及びこれらに対する優先権を主張する。

20

【背景技術】

【0002】

背景

30

従来の遺伝子療法は、宿主細胞に所望の遺伝子情報を挿入するためのDNAの使用を伴う。細胞へと導入されたDNAは通常、1つまたは複数のトランスフェクトされた細胞のゲノムへとある程度組み込まれ、宿主内での導入された遺伝物質の長期的な作用を可能にする。かかる持続的な作用には実質的な利点があり得る一方で、外因性DNAの宿主ゲノムへの組み込みは、多くの有害な作用も有し得る。例えば、導入されたDNAがインタクトな遺伝子へと挿入され、内因性遺伝子の機能を妨げるまたさらには完全に排除する突然変異をもたらすことになる可能性がある。ゆえに、DNAを用いた遺伝子療法は、処置される宿主において、致命的な遺伝子機能の障害、例えば、必須酵素の産生の排除もしくは有害な低下、または細胞成長の制御に決定的に重要な遺伝子の妨害をもたらす可能性があり、非制御または癌性細胞増殖をもたらし得る。加えて、従来のDNAベースの遺伝子療法では、所望の遺伝子産物の効果的な発現のためには強力なプロモーター配列を含める必要があり、これもまた、細胞内の正常な遺伝子発現の制御において望ましくない変化をもたらし得る。また、DNAベースの遺伝物質が望ましくない抗DNA抗体の誘導をもたらし、それが致命的となり得る免疫応答を誘発し得る可能性もある。ウイルスベクターを使用する遺伝子療法アプローチも、有害な免疫応答をもたらし得る。一部の状況では、ウイルスベクターが宿主ゲノムに組み込まれることさえある。加えて、臨床グレードのウイルスベクターの産生は、費用も時間もかかる。ウイルスベクターを使用した導入遺伝物質の標的化送達も、制御が難しくあり得る。ゆえに、DNAベースの遺伝子療法は、ウイルスベクターを使用する分泌タンパク質の送達に関して評価されてきたが（米国特許第6,066,626号；US2004/0110709）、これらのアプローチは、これらのさ

40

50

まざまな理由で制限され得る。

【0003】

DNAとは対照的に、遺伝子療法剤としてのRNAの使用は、RNAがトランスフェクトされた細胞のゲノムへと安定して組み込まれることのリスクを伴わないため、実質的により安全であり、ゆえに導入遺伝物質が必須遺伝子の正常な機能を妨害する、または有害もしくは発癌効果をもたらす突然変異を引き起こす懸念を排除し、外来プロモーター配列は、コードされたタンパク質の効果的な翻訳のために必要とされず、再度、起こり得る有害な副作用を回避する。加えて、mRNAは、その機能を実行するために核に入る必要がないが、DNAはこの大きな障壁を克服しなければならない。

【0004】

環状RNAは、安定した形態のRNAの設計及び産生に役立つ。RNA分子の環状化は、特に、不活性なコンフォメーションで折り畳まれやすい分子の場合、RNA構造及び機能の研究に利点を提供する(Wang and Ruffner, 1998)。環状RNAはまた、特に、タンパク質置換療法及びワクチン接種を含む、遺伝子発現及び治療剤のRNAベースの制御の研究分野において、特に興味深く、インビボ用途に有用であり得る。

【0005】

がん細胞上の抗原を標的とするキメラ抗原受容体(CAR)及び組換えT細胞受容体(TCR)を発現するように遺伝子修飾されたT細胞の使用は、がんの処置のための魅力的な治療戦略である。ただし、CAR及びTCRを発現するようにT細胞を修飾する現在の方法、及び結果得られる治療は、サイトカイン放出症候群(CRS)及び他の合併症の形態で毒性を伴う。CAR及び組換えTCRを発現するように細胞を操作するより安全な方法が依然として必要とされている。

【0006】

本発明の前に、インビトロで環状化RNAを作製するための3つの主要な技術があった：スプリントを介した方法、順列置換イントロン-エクソン法、及びRNAリガーゼを介した方法。ただし、既存の方法論は、環状化できるRNAのサイズによって制限されるため、その治療用途が制限される。

【発明の概要】

【0007】

概要

一態様では、以下の順序で、3'グループイントロンフラグメント、内部リボソーム侵入部位(IRES)、キメラ抗原受容体(CAR)またはT細胞受容体(TCR)複合体タンパク質をコードする発現配列、及び5'グループイントロンフラグメントを含む環状RNAポリヌクレオチド、ならびに(i)イオン化可能脂質、(ii)構造脂質、及び(iii)PEG修飾脂質のうちの少なくとも1つを含む輸送ビヒクルを含む医薬組成物を本明細書に提供し、輸送ビヒクルは、環状RNAポリヌクレオチドを、ヒト対象に存在するヒト免疫細胞に送達することができ、その結果、CARはヒト免疫細胞において翻訳され、ヒト免疫細胞の表面上で発現される。

【0008】

一部の実施形態では、医薬組成物は、それを必要とするヒト対象への静脈内投与用に製剤化されている。一部の実施形態では、3'グループイントロンフラグメント及び5'グループイントロンフラグメントは、アナベナグループイントロンフラグメントである。

【0009】

ある特定の実施形態では、3'イントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントは、インタクテナイントロンのL9a-5順列置換部位によって定義される。ある特定の実施形態では、3'イントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントは、インタクテナイントロンのL8-2順列置換部位によって定義される。

【0010】

一部の実施形態では、IRESは、タウラ症候群ウイルス、トリアトーマウイルス、タイラー脳脊髄炎ウイルス、シミアンウイルス40、ヒアリ(Solenopsis in

10

20

30

40

50

victa) ウイルス1、ムギクビレアブラムシ (*Rhopalosiphum padi*) ウイルス、細網内皮症ウイルス、ヒトポリオウイルス1、チャバネアオカメムシ (*Plautia stali*) 腸ウイルス、カシミールハチウイルス、ヒトライノウイルス2、ホマロディスカ・コアギュラタ (*Homalodisca coagulata*) ウイルス-1、ヒト免疫不全ウイルス1型、*Homalodisca coagulata* ウイルス-1、ヒメトビPウイルス、C型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス、GB型肝炎ウイルス、口蹄疫ウイルス、ヒトエンテロウイルス71、ウマ鼻炎ウイルス、ウスジロエダシャク (*Ectropis obliqua*) ピコルナ様ウイルス、脳心筋炎ウイルス、ショウジョウバエCウイルス、ヒトコクサッキーウイルスB3、アブラナ科トバモウイルス、クリケット麻痺ウイルス、ウシウイルス性下痢ウイルス1、ブラッククイーンセルウイルス、アブラムシ致死麻痺ウイルス、トリ脳脊髄炎ウイルス、急性ミツバチ麻痺ウイルス、ハイビスカスクロロティックリングスポットウイルス、古典的ブタ熱ウイルス、ヒトFGF2、ヒトSFTPA1、ヒトAML1/RUNX1、ショウジョウバエアンテナペディア、ヒトAQP4、ヒトAT1R、ヒトBAG-1、ヒトBCL2、ヒトBiP、ヒトc-IAP1、ヒトc-myc、ヒトeIF4G、マウスNDST4L、ヒトLEF1、マウスHIF1アルファ、ヒトn.myc、マウスGtx、ヒトp27kip1、ヒトPDGF2/c-sis、ヒトp53、ヒトPim-1、マウスRbm3、ショウジョウバエreaper、イヌScamper、ショウジョウバエUbx、ヒトUNR、マウスUtrA、ヒトVEGF-A、ヒトXIAP、ショウジョウバエhairless、*S. cerevisiae* (S. cerevisiae) TFIID、*S. cerevisiae* YAP1、タバコエッチウイルス、カブクリンクルウイルス、EMCV-A、EMCV-B、EMCV-Bf、EMCV-Cf、EMCV pEC9、ピコビルナウイルス、HCV QC64、ヒトコサウイルスE/D、ヒトコサウイルスF、ヒトコサウイルスJMY、ライノウイルスNAT001、HRV14、HRV89、HRVC-02、HRV-A21、サリウイルスA SH1、サリウイルスFHB、サリウイルスNG-J1、ヒトパレコウイルス1、クロヒウイルスB、Yc-3、ロサウイルスM-7、シャンバウイルスA、パシウイルスA、パシウイルスA 2、エコーウイルスE14、ヒトパレコウイルス5、アイチウイルス、A型肝炎ウイルスHA16、フォピウイルス、CVA10、エンテロウイルスC、エンテロウイルスD、エンテロウイルスJ、ヒトペギウイルス2、GBV-C GT110、GBV-C K1737、GBV-C Iowa、ペギウイルスA 1220、パシウイルスA 3、サペロウイルス、ロサウイルスB、バクンサ (*Bakunsa*) ウイルス、トレモウイルスA、ブタパシウイルス1、PLV-CHN、パシウイルスA、シシニウイルス、ヘパシウイルスK、ヘパシウイルスA、BVDV1、ボーダー病ウイルス、BVDV2、CSFV-PK15C、SF573ジシストロウイルス、湖北ピコルナ様ウイルス、CRPV、サリウイルスA BN5、サリウイルスA BN2、サリウイルスA 02394、サリウイルスA GUT、サリウイルスA CH、サリウイルスA SZ1、サリウイルスFHB、CVB3、CVB1、エコーウイルス7、CVB5、EVA71、CVA3、CVA12、EV24、またはeIF4Gに対するアプタマーに由来する。

【0011】

一部の実施形態では、IRESは、CVB3 IRESまたはそのフラグメントもしくは変異体を含む、あるいはIRESは、配列番号65に従う配列を含む。一部の実施形態では、IRESは、サリウイルスSZ1 IRESまたはそのフラグメントもしくは変異体を含む。ある特定の実施形態では、IRESは、配列番号63に従う配列を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、第1の内部スペーサーを3'グループイントロンフラグメント及びIRES間に、ならびに第2の内部スペーサーを発現配列及び5'グループイントロンフラグメント間に含む。ある特定の実施形態では、第1及び第2の内部スペーサーはそれぞれ、約10～約60ヌクレオチドの長さを有する。

【0012】

一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、群：CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、C型レクチン様分子-1、CD33

10

20

30

40

50

、上皮成長因子受容体変異体ⅡⅡⅡ（EGFRvⅡⅡⅡ）、ジシアロガングリオシドGD2、ジサロガングリオシドGD3、TNF受容体ファミリーメンバー、B細胞成熟抗原（BCMA）、Tn抗原（Tn Ag）または（GaINAc a-Ser/Thr）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1（ROR1）、Fms様チロシンキナーゼ3（FLT3）、腫瘍関連糖タンパク質72（TAG72）、CD38、CD44v6、癌胎児性抗原（CEA）、上皮細胞接着分子（EPCAM）、B7H3（CD276）、KIT（CD117）、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2、メソセリン、インターロイキン11受容体アルファ（IL-11Ra）、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、プロテアーゼセリン21、血管内皮成長因子受容体2（VEGFR2）、ルイス（Y）抗原、CD24、血小板由来成長因子受容体ベータ（PDGFR-ベータ）、ステージ特異的胚性抗原-4（SSEA-4）、CD20、葉酸受容体アルファ、HER2、HER3、ムチン1、細胞表面関連（MUC1）、表皮成長因子受容体（EGFR）、神経細胞接着分子（NCAM）、プロスターゼ、前立腺酸性ホスファターゼ（PAP）、伸長因子2突然変異（ELF2M）、エフリンB2、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ（FAP）、インスリン様成長因子1受容体（IGF-I受容体）、炭酸アンヒドラーゼIX（CAIX）、プロテアソーム（プロソーム、マクロペイン）サブユニット、ベータタイプ、9（LMP2）、糖タンパク質100（gp100）、ブレイクポイントクラスター領域（BCR）及びアベルソンマウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ1（Abl）からなる癌遺伝子融合タンパク質（bcr-abl）、チロシナーゼ、エフリンA型受容体2（EphA2）、フコシルGM1、シアリルルイス接着分子（sLe）、ガングリオシドGM3、トランスグルタミナーゼ5（TGS5）、高分子量黒色腫関連抗原（HMWMAA）、o-アセチル-GD2ガングリオシド（OAcGD2）、葉酸受容体ベータ、腫瘍内皮マーカー1（TEM1/CD248）、腫瘍内皮マーカー7関連（TEM7R）、クローディン6（CLDN6）、クローディン18.2（CLDN18.2）、甲状腺刺激ホルモン受容体（TSHR）、Gタンパク質共役型受容体クラスCグループ5、メンバーD（GPRC5D）、染色体Xオープンリーディングフレーム61（CXORF61）、CD97、及びCD179aから選択される抗原に特異的な抗原結合ドメインを含む。

【0013】

一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、CD19に特異的な抗原結合ドメインを含むCARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、群CD28、4-1BB、OX40、CD27、CD30、ICOS、GITR、CD40、CD2、SLAM、及びそれらの組み合わせから選択される共刺激ドメインを含むCARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むCARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、CH2CH3、CD28、及び／またはCD8スパーサードメインを含むCARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、CD28またはCD8膜貫通ドメインを含むCARを含む。

【0014】

一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、抗原結合ドメイン、スパーサードメイン、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び細胞内T細胞シグナル伝達ドメインを含むCARを含む。

【0015】

一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、少なくとも2つの異なる抗原に対する抗原結合ドメインを含む多重特異性CARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、群TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、及びTCRデルタから選択されるTCR複合体タンパク質を含む。一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、脂質ナノ粒子、コアシェルナノ粒子、生分解性ナノ粒子、生分解性脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、または生分解性ポリマーナノ粒子を含む。

【0016】

一部の実施形態では、医薬組成物は、標的化部分をさらに含む。ある特定の実施形態では、標的化部分は、細胞単離または精製の非存在下で、選択された細胞集団または組織の選択された細胞への受容体媒介性エンドサイトーシスまたは直接融合を媒介する。ある特定の実施形態では、標的化部分は、群CD3、CD4、CD8、CD5、CD7、PD-1、4-1BB、CD28、C1q、及びCD2から選択されるタンパク質に結合することができる。ある特定の実施形態では、標的化部分は、マクロファージ、樹状細胞、NK細胞、NKT、またはT細胞抗原に特異的な抗体を含む。ある特定の実施形態では、標的化部分は、scFv、ナノボディ、ペプチド、ミニボディ、ポリヌクレオチドアプタマー、重鎖可変領域、軽鎖可変領域またはそのフラグメントを含む。

【0017】

一部の実施形態では、医薬組成物は、ヒト対象においてがんを処置するのに有効な量で投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は、同じCARをコードする外因性DNAを含むT細胞またはベクターを含む医薬組成物と比較した場合、向上した安全性プロファイルを有する。

【0018】

一部の実施形態では、組成物内のポリヌクレオチドの1重量%未満が、二本鎖RNA、DNAスプリント、または三リン酸化RNAである。

【0019】

一部の実施形態では、医薬組成物内のポリヌクレオチド及びタンパク質の1重量%未満が、二本鎖RNA、DNAスプリント、三リン酸化RNA、ホスファターゼタンパク質、タンパク質リガーゼ、及びキャッピング酵素である。一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、1つより多い環状RNAポリヌクレオチドを含む。

【0020】

別の態様では、本開示は、以下の順序で、3'グループイントロンフラグメント、内部リボソーム侵入部位(IRES)、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR複合体タンパク質をコードする発現配列、及び5'グループイントロンフラグメントを含む、環状RNAポリヌクレオチドを提供する。

【0021】

一部の実施形態では、3'グループイントロンフラグメント及び5'グループイントロンフラグメントは、アナベナグループイントロンフラグメントである。ある特定の実施形態では、3'イントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントは、インタクトなイントロンのL9a-5順列置換部位によって定義される。ある特定の実施形態では、3'イントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントは、インタクトなイントロンのL8-2順列置換部位によって定義される。ある特定の実施形態では、IRESは、CVB3 IRESまたはそのフラグメントもしくは変異体を含む。ある特定の実施形態では、IRESは、配列番号65に従う配列を有する。一部の実施形態では、IRESは、サリウイルスSZ1 IRESまたはそのフラグメントもしくは変異体を含む。ある特定の実施形態では、IRESは、配列番号63に従う配列を有する。

【0022】

一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、第1の内部スパーサーを3'グループイントロンフラグメント及びIRES間に、ならびに第2の内部スパーサーを発現配列及び5'グループイントロンフラグメント間に含む。

【0023】

ある特定の実施形態では、第1及び第2の内部スパーサーはそれぞれ、約10〜約60ヌクレオチドの長さを有する。

【0024】

一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、天然ヌクレオチドからなる。一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、治療用タンパク質をコードする第2の発現配列をさらに含む。一部の実施形態では、治療用タンパク質は、チェックポイント阻害剤を含む。ある特定の実施形態では、治療用タンパク質は、サイトカインを含む。

10

20

30

40

50

【0025】

一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、群：CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、C型レクチン様分子-1、CD33、上皮成長因子受容体変異体III（EGFRvIII）、ジシアロガングリオシドGD2、ジシアロガングリオシドGD3、TNF受容体ファミリーメンバー、B細胞成熟抗原（BCMA）、Tn抗原（Tn Ag）または（GaINAc-Ser/Thr）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1（ROR1）、Fms様チロシンキナーゼ3（FLT3）、腫瘍関連糖タンパク質72（TAG72）、CD38、CD44v6、癌胎児性抗原（CEA）、上皮細胞接着分子（EPCAM）、B7H3（CD276）、KIT（CD117）、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2、メソセリン、インターロイキン11受容体アルファ（IL-11Ra）、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、プロテアーゼセリン21、血管内皮成長因子受容体2（VEGFR2）、ルイス（Y）抗原、CD24、血小板由来成長因子受容体ベータ（PDGFR-ベータ）、ステージ特異的胚性抗原-4（SSEA-4）、CD20、葉酸受容体アルファ、HER2、HER3、ムチン1、細胞表面関連（MUC1）、表皮成長因子受容体（EGFR）、神経細胞接着分子（NCAM）、プロスターゼ、前立腺酸性ホスファターゼ（PAP）、伸長因子2突然変異（ELF2M）、エフリンB2、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ（FAP）、インスリン様成長因子1受容体（IGF-I受容体）、炭酸アンヒドラーゼIX（CAIX）、プロテアソーム（プロソーム、マクロペイン）サブユニット、ベータタイプ、9（LMP2）、糖タンパク質100（gp100）、ブレイクポイントクラスター領域（BCR）及びアベルソンマウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ1（Abl）からなる癌遺伝子融合タンパク質（bcr-abl）、チロシナーゼ、エフリンA型受容体2（EphA2）、フコシルGM1、シアリルルイス接着分子（sLe）、ガングリオシドGM3、トランスグルタミナーゼ5（TGS5）、高分子量黒色腫関連抗原（HMWMAA）、o-アセチル-GD2ガングリオシド（OAcGD2）、葉酸受容体ベータ、腫瘍内皮マーカー1（TEM1/CD248）、腫瘍内皮マーカー7関連（TEM7R）、クローディン6（CLDN6）、クローディン18.2（CLDN18.2）、甲状腺刺激ホルモン受容体（TSHR）、Gタンパク質共役型受容体クラスCグループ5、メンバーD（GPCR5D）、染色体Xオープンリーディングフレーム61（CXORF61）、CD97、及びCD179aから選択される抗原に特異的な抗原結合ドメインを含む。

【0026】

一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、CD19に特異的な抗原結合ドメインを含むCARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、群CD28、4-1BB、OX40、CD27、CD30、ICOS、GITR、CD40、CD2、SLAM、及びそれらの組み合わせから選択される共刺激ドメインを含むCARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むCARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、CH2CH3、CD28、及び/またはCD8スーパーサードメインを含むCARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、CD28またはCD8膜貫通ドメインを含むCARを含む。

【0027】

一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、抗原結合ドメイン、スーパーサードメイン、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び細胞内T細胞シグナル伝達ドメインを含むCARを含む。

【0028】

一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、少なくとも2つの異なる抗原に対する抗原結合ドメインを含む多重特異性CARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、群TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、及びTCRデルタから選択されるTCR複合体タンパク質を含む。

【0029】

一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、天然ヌクレオチドからなる。

【0030】

一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチド発現配列は、コドン最適化されている。一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、同等の事前に最適化されたポリヌクレオチドに存在する少なくとも1つのマイクロRNA結合部位を欠くように最適化される。一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、同等の事前に最適化されたポリヌクレオチドに存在する少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ感受性部位を欠くように最適化される。一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、同等の事前に最適化されたポリヌクレオチドに存在する少なくとも1つのRNA編集感受性部位を欠くように最適化される。

10

【0031】

一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、同じ発現配列を有する同等の線状RNAポリヌクレオチドの機能的半減期よりも長い、ヒトにおけるインビボ機能的半減期を有する。一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、約100ヌクレオチド〜約10キロボースの長さを有する。一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、少なくとも約20時間の機能的半減期を有する。一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、少なくとも約20時間のヒト細胞における治療効果の持続時間を有する。一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、同じ発現配列を含む同等の線状RNAポリヌクレオチドの治療効果の持続時間以上の、ヒト細胞における治療効果の持続時間を有する。一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、同じ発現配列を含む同等の線状RNAポリヌクレオチドの機能的半減期以上の、ヒト細胞における機能的半減期を有する。

20

【0032】

別の態様では、本開示は、以下の順序で、5'二重鎖形成領域、アナベナ3'グループエイントロンフラグメントと第1の順列置換部位、内部リボソーム侵入部位(IRES)、キメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチドをコードする発現配列、アナベナ5'グループエイントロンフラグメントと第2の順列置換部位、及び3'二重鎖形成領域を含む、DNAベクターを提供する。

【0033】

一部の実施形態では、3'グループエイントロンフラグメント及び5'グループエイントロンフラグメントは、アナベナグループエイントロンフラグメントである。一部の実施形態では、3'イントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントは、インタクトなイントロンのL9a-5順列置換部位によって定義される。一部の実施形態では、3'イントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントは、インタクトなイントロンのL8-2順列置換部位によって定義される。一部の実施形態では、IRESは、CVB3 IRESまたはそのフラグメントもしくは変異体を含む。

30

【0034】

一部の実施形態では、IRESは、配列番号65に従って配列をコードする。一部の実施形態では、IRESは、サリウウイルスSZ1 IRESまたはそのフラグメントもしくは変異体を含む。一部の実施形態では、IRESは、配列番号63に従って配列をコードする。一部の実施形態では、環状RNAポリヌクレオチドは、以下の順序で、5'二重鎖形成領域、3'グループエイントロンフラグメント、内部リボソーム侵入部位(IRES)、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR複合体タンパク質をコードする発現配列、5'グループエイントロンフラグメント、及び3'二重鎖形成領域を含む。一部の実施形態では、5'二重鎖形成領域及び3'二重鎖形成領域はそれぞれ、約70%GCヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、5'二重鎖形成領域及び3'二重鎖形成領域はそれぞれ、約30ヌクレオチドの長さを有する。

40

【0035】

一部の実施形態では、DNAベクターは、第1の外部スパーサーを5'二重鎖形成領域及

50

び3'グループイントロンフラグメント間に、ならびに第2の外部スパーサーを5'グループイントロンフラグメント及び3'二重鎖形成領域間に含む。一部の実施形態では、第1及び第2の外部スパーサーはそれぞれ、約10～約60ヌクレオチドの長さを有する。一部の実施形態では、5'二重鎖形成領域は、3'グループイントロンフラグメントに直接隣接しており、5'グループイントロンフラグメントは、3'二重鎖形成領域に直接隣接している。一部の実施形態では、DNAベクターは、第1の内部スパーサーを3'グループイントロンフラグメント及びIRES間に、ならびに第2の内部スパーサーを発現配列及び5'グループイントロンフラグメント間に含む。一部の実施形態では、第1及び第2の内部スパーサーはそれぞれ、約10～約60ヌクレオチドの長さを有する。

【0036】

一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、群：CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、C型レクチン様分子-1、CD33、上皮成長因子受容体変異体III(EGFRvIII)、ジシアロガングリオシドGD2、ジシアロガングリオシドGD3、TNF受容体ファミリーメンバー、B細胞成熟抗原(BCMA)、Tn抗原(TnAg)または(GaINAc-a-Ser/Thr)、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1(OR1)、Fms様チロシンキナーゼ3(FLT3)、腫瘍関連糖タンパク質72(TAG72)、CD38、CD44v6、癌胎児性抗原(CEA)、上皮細胞接着分子(EPCAM)、B7H3(CD276)、KIT(CD117)、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2、メソセリン、インターロイキン11受容体アルファ(IL-11Ra)、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、プロテアーゼセリン21、血管内皮成長因子受容体2(VEGFR2)、ルイス(Y)抗原、CD24、血小板由来成長因子受容体ベータ(PDGFR-ベータ)、ステージ特異的胚性抗原-4(SSEA-4)、CD20、葉酸受容体アルファ、HER2、HER3、ムチン1、細胞表面関連(MUC1)、表皮成長因子受容体(EGFR)、神経細胞接着分子(NCAM)、プロスターゼ、前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)、伸長因子2突然変異(ELF2M)、エフリンB2、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ(FAP)、インスリン様成長因子1受容体(IGF-I受容体)、炭酸アンヒドラーゼIX(CAIX)、プロテアソーム(プロソーム、マクロペイン)サブユニット、ベータタイプ、9(LMP2)、糖タンパク質100(gp100)、ブレイクポイントクラスター領域(BCR)及びアベルソンマウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ1(Abl)からなる癌遺伝子融合タンパク質(bcr-abl)、チロシナーゼ、エフリンA型受容体2(EphA2)、フコシルGM1、シアリルルイス接着分子(sLe)、ガングリオシドGM3、トランスグルタミナーゼ5(TGS5)、高分子量黒色腫関連抗原(HMWMAA)、o-アセチル-GD2ガングリオシド(OAcGD2)、葉酸受容体ベータ、腫瘍内皮マーカー1(TEM1/CD248)、腫瘍内皮マーカー7関連(TEM7R)、クローディン6(CLDN6)、クローディン18.2(CLDN18.2)、甲状腺刺激ホルモン受容体(TSHR)、Gタンパク質共役型受容体クラスCグループ5、メンバーD(GPRC5D)、染色体Xオープンリーディングフレーム61(CXORF61)、CD97、及びCD179aから選択される抗原に特異的な抗原結合ドメインを含む。

【0037】

一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、CD19に特異的な抗原結合ドメインを含むCARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、群CD28、4-1BB、OX40、CD27、CD30、ICOS、GITR、CD40、CD2、SLAM、及びそれらの組み合わせから選択される共刺激ドメインを含むCARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むCARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、CH2CH3、CD28、及び/またはCD8スパーサードメインを含むCARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、CD28またはCD8膜貫通ドメインを含むCARを含む。

【0038】

一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、抗原結合ドメイン、スペーサドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び細胞内T細胞シグナル伝達ドメインを含むCARを含む。

【0039】

一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、少なくとも2つの異なる抗原に対する抗原結合ドメインを含む多重特異性CARを含む。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、群TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、及びTCRデルタから選択されるTCR複合体タンパク質を含む。

【0040】

別の態様では、本開示は、以下の順序で、3'グループイントロンフラグメント、内部リボソーム侵入部位(IRES)、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR複合体タンパク質をコードする発現配列、及び5'グループイントロンフラグメントを含む環状RNAポリヌクレオチドを含む、真核細胞を提供する。一部の実施形態では、真核細胞は、ヒト細胞を含む。一部の実施形態では、真核細胞は、免疫細胞を含む。一部の実施形態では、真核細胞は、T細胞を含む。

【0041】

別の態様では、本開示は、以下の順序で、3'グループイントロンフラグメント、内部リボソーム侵入部位(IRES)、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR複合体タンパク質をコードする発現配列、及び5'グループイントロンフラグメントを含む環状RNAポリヌクレオチドを含む、真核細胞の集団を提供し、真核細胞の集団は、環状RNAポリヌクレオチドによってコードされるCARまたはTCR複合体タンパク質をその細胞表面上に発現する。

【0042】

一部の実施形態では、細胞の集団は、NK細胞、NKT細胞、マクロファージ、樹状細胞、アルファベータT細胞、ガンマデルタT細胞、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、細胞の集団は、T細胞を含む。一部の実施形態では、集団は、CD3+T細胞を含む。一部の実施形態では、集団は、CD4+T細胞を含む。一部の実施形態では、集団は、CD8+T細胞を含む。一部の実施形態では、真核細胞の集団は、それを必要とするヒト対象においてがんを処置するのに有効な量で投与される。一部の実施形態では、細胞の集団は、同じCARをコードする線状RNAを含む真核細胞の同等の集団よりも効果的にまたはより長く腫瘍細胞を死滅させる。

【0043】

別の態様では、真核細胞の集団を作製する方法を本明細書に提供し、該方法は、集団内の細胞を、以下の順序で、3'グループイントロンフラグメント、内部リボソーム侵入部位(IRES)、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR複合体タンパク質をコードする発現配列、及び5'グループイントロンフラグメントを含む環状RNAポリヌクレオチドを含む輸送ビヒクルと接触させることを含み、輸送ビヒクルは、(i)イオン化可能脂質、(ii)構造脂質、及び(iii)PEG修飾脂質を含み、輸送ビヒクルは、環状RNAポリヌクレオチドをヒト免疫細胞に送達することができ、その結果、CARがヒト免疫細胞において翻訳され、ヒト免疫細胞の表面上で発現される。

【0044】

別の態様では、処置を必要とする対象を処置する方法を本明細書に提供し、該方法は、以下の順序で、3'グループイントロンフラグメント、内部リボソーム侵入部位(IRES)、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR複合体タンパク質をコードする発現配列、及び5'グループイントロンフラグメントを含む環状RNAポリヌクレオチド、ならびに(i)イオン化可能脂質、(ii)構造脂質、及び(iii)PEG修飾脂質を含む輸送ビヒクルを含む、治療有効量の医薬組成物を投与することを含み、輸送ビヒクルは、環状RNAポリヌクレオチドをヒト免疫細胞に送達することができ、その結果、CARはヒト免疫細胞において翻訳され、ヒト免疫細胞の表面上で発現される。

【0045】

一部の実施形態では、対象は、群、急性リンパ球性癌、急性骨髄性白血病（AML）、肺胞横紋筋肉腫、膀胱癌（例えば、膀胱癌）、骨癌、脳癌（例えば、髄芽細胞腫）、乳癌、肛門、肛門管、または肛門直腸のがん、眼のがん、肝内胆管のがん、関節のがん、首、胆嚢、または胸膜のがん、鼻、鼻腔、または中耳のがん、口腔のがん、外陰部のがん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性癌、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、線維肉腫、消化管カルチノイド腫瘍、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌）、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、腎臓癌、喉頭癌、白血病、液性腫瘍、肝臓癌、肺癌（例えば、非小細胞肺癌及び肺腺癌）、リンパ腫、中皮腫、肥満細胞腫、黒色腫、多発性骨髄腫、上咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、B-慢性リンパ球性白血病、有毛細胞白血病、急性リンパ球性白血病（ALL）、及びバーキットリンパ腫、卵巣癌、膵臓癌、腹膜、大網、及び腸間膜癌、咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎癌、皮膚癌、小腸癌、軟部組織癌、固形腫瘍、滑膜肉腫、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、ならびに尿管癌から選択されるがんを有する。

10

【0046】

別の態様では、内部リボソーム侵入部位（IRES）、キメラ抗原受容体（CAR）ポリペプチドをコードする発現配列、及び少なくとも1つの自己環状化エレメントを含むRNAポリヌクレオチドを本明細書に提供する。

【0047】

一部の実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、5'二重鎖形成領域、アナベナ3'グループイントロンフラグメントと第1の順列置換部位、内部リボソーム侵入部位（IRES）、キメラ抗原受容体（CAR）ポリペプチドをコードする発現配列、アナベナ5'グループイントロンフラグメントと第2の順列置換部位、及び3'二重鎖形成領域を含む。一部の実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、5'二重鎖形成領域、第1の順列置換部位、内部リボソーム侵入部位（IRES）、キメラ抗原受容体（CAR）ポリペプチドをコードする発現配列、第2の順列置換部位、及び3'二重鎖形成領域を含む。一部の実施形態では、自己環状化エレメントは、グループイントロンフラグメントである。一部の実施形態では、3'グループイントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメント。一部の実施形態では、3'グループイントロンフラグメント及び5'グループイントロンフラグメントは、アナベナグループイントロンフラグメントである。一部の実施形態では、3'イントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントは、インタクトなイントロンのL9a-5順列置換部位によって定義される。一部の実施形態では、3'イントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントは、インタクトなイントロンのL8-2順列置換部位によって定義される。一部の実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、酵素の非存在下で環状化することができる。一部の実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、天然ヌクレオチドからなる。

20

30

【0048】

別の態様では、本開示は、上記の実施形態のうちの1つのRNAポリヌクレオチドの合成に好適なDNAベクターを提供する。

【0049】

一部の実施形態では、本開示の環状RNAポリヌクレオチドは、非脂質ポリマーコアシエルナノ粒子において標的細胞に送達される。

40

[本発明1001]

a. 以下の順序で、3'グループイントロンフラグメントと、内部リボソーム侵入部位（IRES）と、キメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR）複合体タンパク質をコードする発現配列と、5'グループイントロンフラグメントとを含む、環状RNAポリヌクレオチド、ならびに

b. (i) イオン化可能脂質、(ii) 構造脂質、及び(iii) PEG修飾脂質のうちの少なくとも1つを含む、輸送ビヒクルを含む、医薬組成物であって、

前記輸送ビヒクルが、前記環状RNAポリヌクレオチドを、ヒト対象に存在するヒト免

50

疫細胞に送達することができ、その結果、前記CARが前記ヒト免疫細胞において翻訳され、前記ヒト免疫細胞の表面上で発現される、前記医薬組成物。

[本発明1002]

その必要がある前記ヒト対象への静脈内投与用に製剤化された、本発明1001の医薬組成物。

[本発明1003]

前記3'グループイントロンフラグメント及び5'グループイントロンフラグメントが、アナベナグループイントロンフラグメントである、本発明1001または1002の医薬組成物。

[本発明1004]

前記3'イントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントが、インタクトなイントロン内のL9a-5順列置換部位によって定義される、本発明1003の医薬組成物。

[本発明1005]

前記3'イントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントが、インタクトなイントロン内のL8-2順列置換部位によって定義される、本発明1003の医薬組成物。

[本発明1006]

前記IRESが、タウラ症候群ウイルス、トリアトーマウイルス、タイラー脳脊髄炎ウイルス、シミアンウイルス40、ヒアリ (*Solenopsis invicta*) ウイルス1、ムギクビレアブラムシ (*Rhopalosiphum padi*) ウイルス、細網内皮症ウイルス、ヒトポリオウイルス1、チャバネアオカメムシ (*Plautia stali*) 腸ウイルス、カシミールハチウイルス、ヒトライノウイルス2、ホマロディスカ・コアギュラタ (*Homalodisca coagulata*) ウイルス-1、ヒト免疫不全ウイルス1型、ホマロディスカ・コアギュラタウイルス-1、ヒメトビPウイルス、C型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス、GB型肝炎ウイルス、口蹄疫ウイルス、ヒトエンテロウイルス71、ウマ鼻炎ウイルス、ウスジロエダシャク (*Ectropis obliqua*) ピコルナ様ウイルス、脳心筋炎ウイルス、ショウジョウバエCウイルス、ヒトコクサッキーウイルスB3、アブラナ科トバモウイルス、クリケット麻痺ウイルス、ウシウイルス性下痢ウイルス1、ブラッククイーンセルウイルス、アブラムシ致死麻痺ウイルス、トリ脳脊髄炎ウイルス、急性ミツバチ麻痺ウイルス、ハイビスカスクロロティックリングスポットウイルス、古典的ブタ熱ウイルス、ヒトFGF2、ヒトSFTPA1、ヒトAML1/RUNX1、ショウジョウバエアンテナペディア、ヒトAQP4、ヒトAT1R、ヒトBAG-1、ヒトBCL2、ヒトBiP、ヒトc-IAP1、ヒトc-myc、ヒトeIF4G、マウスNDST4L、ヒトLEF1、マウスHIF1アルファ、ヒトn.myc、マウスGtx、ヒトp27kip1、ヒトPDGF2/c-sis、ヒトp53、ヒトPim-1、マウスRbm3、ショウジョウバエreaper、イヌScamper、ショウジョウバエUbx、ヒトUNR、マウスUtrA、ヒトVEGF-A、ヒトXIAP、ショウジョウバエhairless、S.セレビスエ (*S. cerevisiae*) TFIID、S.セレビスエYAP1、タバコエッチウイルス、カブクリンクルウイルス、EMCV-A、EMCV-B、EMCV-Bf、EMCV-Cf、EMCVpEC9、ピコビルナウイルス、HCV QC64、ヒトコサウイルスE/D、ヒトコサウイルスF、ヒトコサウイルスJMY、ライノウイルスNAT001、HRV14、HRV89、HRVC-02、HRV-A21、サリウイルスASH1、サリウイルスFHB、サリウイルスNG-J1、ヒトパレコウイルス1、クロヒウイルスB、Yc-3、ロサウイルスM-7、シャンバウイルスA、パシウイルスA、パシウイルスA2、エコーウイルスE14、ヒトパレコウイルス5、アイチウイルス、A型肝炎ウイルスHA16、フォピウイルス、CVA10、エンテロウイルスC、エンテロウイルスD、エンテロウイルスJ、ヒトペギウイルス2、GBV-C GT110、GBV-C K1737、GBV-C Iowa、ペギウイルスA1220、パシウイルスA3、サベロウイルス、ロサウイルスB、バクンサ (*Bakunsa*) ウイルス、トレモウイルスA、ブタバシウイルス1、PLV-CHN、パシウイルスA、シシニウイルス、ヘパシウイルスK、ヘパシウ

10

20

30

40

50

イルスA、BVDV1、ボーダー病ウイルス、BVDV2、CSFV-PK15C、SF573ジシストロウイルス、湖北ピコルナ様ウイルス、CRPV、サリウイルスA BN5、サリウイルスA BN2、サリウイルスA 02394、サリウイルスA GUT、サリウイルスA CH、サリウイルスA SZ1、サリウイルスFHB、CVB3、CVB1、エコーウイルス7、CVB5、EVA71、CVA3、CVA12、EV24、またはeIF4Gに対するアプタマーに由来する、本発明1001～1005のいずれかの医薬組成物。

[本発明1007]

前記IRESが、CVB3 IRESまたはそのフラグメントもしくは変異体を含む、あるいは前記IRESが、配列番号65に従う配列を含む、本発明1006の医薬組成物。

[本発明1008]

前記IRESが、サリウイルスSZ1 IRESまたはそのフラグメントもしくは変異体を含む、本発明1006の医薬組成物。

[本発明1009]

前記IRESが、配列番号63に従う配列を含む、本発明1008の医薬組成物。

[本発明1010]

第1の内部スペーサーを、前記3'グループイントロンフラグメントと前記IRESとの間に、及び

第2の内部スペーサーを、前記発現配列と前記5'グループイントロンフラグメントとの間に

含む、本発明1001～1009のいずれかの医薬組成物。

[本発明1011]

前記第1及び第2の内部スペーサーがそれぞれ、約10～約60ヌクレオチドの長さを有する、本発明1010の医薬組成物。

[本発明1012]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、C型レクチン様分子-1、CD33、上皮成長因子受容体変異体III(EGFRvIII)、ジシアロガングリオシドGD2、ジシアロガングリオシドGD3、TNF受容体ファミリーメンバー、B細胞成熟抗原(BCMA)、Tn抗原((Tn Ag)または(GaINAc-a-Ser/Thr))、前立腺特異的膜抗原(PSPA)、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1(ROR1)、Fms様チロシンキナーゼ3(FLT3)、腫瘍関連糖タンパク質72(TAG72)、CD38、CD44v6、癌胎児性抗原(CEA)、上皮細胞接着分子(EPCAM)、B7H3(CD276)、KIT(CD117)、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2、メソセリン、インターロイキン11受容体アルファ(IL-11Ra)、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、プロテアーゼセリン21、血管内皮成長因子受容体2(VEGFR2)、ルイス(Y)抗原、CD24、血小板由来成長因子受容体ベータ(PDGFR-ベータ)、ステージ特異的胚性抗原-4(SSEA-4)、CD20、葉酸受容体アルファ、HER2、HER3、ムチン1、細胞表面関連(MUC1)、表皮成長因子受容体(EGFR)、神経細胞接着分子(NCAM)、プロスターゼ、前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)、伸長因子2突然変異(ELF2M)、エフリンB2、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ(FAP)、インスリン様成長因子1受容体(IGF-I受容体)、炭酸アンヒドラーゼIX(CAIX)、プロテアソーム(プロソーム、マクロペイン)サブユニット、ベータタイプ、9(LMP2)、糖タンパク質100(gp100)、ブレークポイントクラスター領域(BCR)及びアベルソンマウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ1(ABL)からなる癌遺伝子融合タンパク質(bcr-abl)、チロシナーゼ、エフリンA型受容体2(EphA2)、フコシルGM1、シアリルルイス接着分子(sLe)、ガングリオシドGM3、トランスグルタミナーゼ5(TGS5)、高分子量黒色腫関連抗原(HMWMAA)、o-アセチル-GD2ガングリオシド(OAcGD2)、葉酸受容体ベータ、腫瘍内皮マーカー1(TEM1/CD248)、腫瘍内皮マーカー7

10

20

30

40

50

関連（TEM7R）、クローディン6（CLDN6）、クローディン18.2（CLDN18.2）、甲状腺刺激ホルモン受容体（TSHR）、Gタンパク質共役型受容体クラスCグループ5、メンバーD（GPCR5D）、染色体Xオープンリーディングフレーム61（CXORF61）、CD97、及びCD179aの群から選択される抗原に特異的な抗原結合ドメインを含む、本発明1001～1011のいずれかの医薬組成物。

[本発明1013]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、CD19に特異的な抗原結合ドメインを含むCARを含む、本発明1012の医薬組成物。

[本発明1014]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、CD28、4-1BB、OX40、CD27、CD30、ICOS、GITR、CD40、MYD88、CD2、SLAM、及びそれらの組み合わせの群から選択される共刺激ドメインを含むCARを含む、本発明1001～1013のいずれかの医薬組成物。

[本発明1015]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むCARを含む、本発明1001～1014のいずれかの医薬組成物。

[本発明1016]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、CH2CH3、CD28、及び／またはCD8スペーサードメインを含むCARを含む、本発明1001～1015のいずれかの医薬組成物。

[本発明1017]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、CD28またはCD8膜貫通ドメインを含むCARを含む、本発明1001～1016のいずれかの医薬組成物。

[本発明1018]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、

- a. 抗原結合ドメイン、
- b. スペーサードメイン、
- c. 膜貫通ドメイン、
- d. 共刺激ドメイン、及び
- e. 細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン

を含むCARを含む、本発明1001～1017のいずれかの医薬組成物。

[本発明1019]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、少なくとも2つの異なる抗原に対する抗原結合ドメインを含む多重特異性CARを含む、本発明1001～1018のいずれかの医薬組成物。

[本発明1020]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、及びTCRデルタの群から選択されるTCR複合体タンパク質を含む、本発明1001～1019のいずれかの医薬組成物。

[本発明1021]

前記輸送ビヒクルが、脂質ナノ粒子、コアシェルナノ粒子、生分解性ナノ粒子、生分解性脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、または生分解性ポリマーナノ粒子を含む、本発明1001～1020のいずれかの医薬組成物。

[本発明1022]

標的化部分をさらに含む、本発明1001～1021のいずれかの医薬組成物。

[本発明1023]

前記標的化部分が、細胞単離または精製の非存在下で、選択された細胞集団または組織の選択された細胞への受容体媒介性エンドサイトーシスまたは直接融合を媒介する、本発明1022の医薬組成物。

[本発明1024]

前記標的化部分が、CD3、CD4、CD8、CD5、CD7、PD-1、4-1BB、CD28、C1q、及びCD2の群から選択されるタンパク質に結合することができる、本発明1022の医薬組成物。

[本発明1025]

前記標的化部分が、マクロファージ、樹状細胞、NK細胞、NKT、またはT細胞抗原に特異的な抗体を含む、本発明1022の医薬組成物。

[本発明1026]

前記標的化部分が、scFv、ナノボディ、ペプチド、ミニボディ、ポリヌクレオチドアプタマー、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、またはそのフラグメントを含む、本発明1022～1025のいずれかの医薬組成物。

[本発明1027]

前記ヒト対象においてがんを処置するのに有効な量の、本発明1001～1026のいずれかの医薬組成物。

[本発明1028]

同じCARをコードする外因性DNAを含むT細胞またはベクターを含む医薬組成物と比較した場合、向上した安全性プロファイルを有する、本発明1001～1027のいずれかの医薬組成物。

[本発明1029]

前記組成物内の前記ポリヌクレオチドの1重量%未満が、二本鎖RNA、DNAスプリント、または三リン酸化RNAである、本発明1001～1028のいずれかの医薬組成物。

[本発明1030]

前記医薬組成物内の前記ポリヌクレオチド及びタンパク質の1重量%未満が、二本鎖RNA、DNAスプリント、三リン酸化RNA、ホスファターゼタンパク質、タンパク質リガーゼ、及びキャッピング酵素である、本発明1001～1029のいずれかの医薬組成物。

[本発明1031]

前記輸送ビヒクルが、1つより多い環状RNAポリヌクレオチドを含む、本発明1001～1030のいずれかの医薬組成物。

[本発明1032]

以下の順序で、3'グループイントロンフラグメントと、内部リボソーム侵入部位(IRES)と、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR複合体タンパク質をコードする発現配列と、5'グループイントロンフラグメントとを含む、環状RNAポリヌクレオチド。

[本発明1033]

前記3'グループイントロンフラグメント及び5'グループイントロンフラグメントが、アナベナグループイントロンフラグメントである、本発明1032の環状RNAポリヌクレオチド。

[本発明1034]

前記3'イントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントが、インタクトなイントロン内のL9a-5順列置換部位によって定義される、本発明1033の環状RNAポリヌクレオチド。

[本発明1035]

前記3'イントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントが、インタクトなイントロン内のL8-2順列置換部位によって定義される、本発明1033の環状RNAポリヌクレオチド。

[本発明1036]

前記IRESが、CVB3 IRESまたはそのフラグメントもしくは変異体を含む、本発明1032～1035のいずれかの環状RNAポリヌクレオチド。

[本発明1037]

前記 I R E S が、配列番号 6 5 に従う配列を有する、本発明 1 0 3 6 の環状 R N A ポリヌクレオチド。

[本発明 1 0 3 8]

前記 I R E S が、サリウイルス S Z 1 I R E S またはそのフラグメントもしくは変異体を含む、本発明 1 0 3 2 の環状 R N A ポリヌクレオチド。

[本発明 1 0 3 9]

前記 I R E S が、配列番号 6 3 に従う配列を有する、本発明 1 0 3 8 の環状 R N A ポリヌクレオチド。

[本発明 1 0 4 0]

第 1 の内部スペーサーを、前記 3 ' グループ イントロンフラグメントと前記 I R E S との間に、及び

第 2 の内部スペーサーを、前記発現配列と前記 5 ' グループ イントロンフラグメントとの間に

含む、本発明 1 0 3 2 ~ 1 0 3 9 のいずれかの環状 R N A ポリヌクレオチド。

[本発明 1 0 4 1]

前記第 1 及び第 2 の内部スペーサーがそれぞれ、約 1 0 ~ 約 6 0 ヌクレオチドの長さを有する、本発明 1 0 4 0 の環状 R N A ポリヌクレオチド。

[本発明 1 0 4 2]

天然ヌクレオチドからなる、本発明 1 0 3 2 ~ 1 0 4 1 のいずれかの環状 R N A ポリヌクレオチド。

[本発明 1 0 4 3]

治療用タンパク質をコードする第 2 の発現配列をさらに含む、本発明 1 0 3 2 ~ 1 0 4 2 のいずれかの環状 R N A ポリヌクレオチド。

[本発明 1 0 4 4]

前記治療用タンパク質が、チェックポイント阻害剤を含む、本発明 1 0 4 3 の環状 R N A ポリヌクレオチド。

[本発明 1 0 4 5]

前記治療用タンパク質が、サイトカインを含む、本発明 1 0 4 3 の環状 R N A ポリヌクレオチド。

[本発明 1 0 4 6]

前記 C A R または T C R 複合体タンパク質が、C D 1 9、C D 1 2 3、C D 2 2、C D 3 0、C D 1 7 1、C S - 1、C 型レクチン様分子 - 1、C D 3 3、上皮成長因子受容体変異体 I I I (E G F R v I I I)、ジシアロガングリオシド G D 2、ジサロガングリオシド G D 3、T N F 受容体ファミリーメンバー、B 細胞成熟抗原 (B C M A)、T n 抗原 ((T n A g) または (G a I N A c a - S e r / T h r))、前立腺特異的膜抗原 (P S M A)、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体 1 (R O R 1)、F m s 様チロシンキナーゼ 3 (F L T 3)、腫瘍関連糖タンパク質 7 2 (T A G 7 2)、C D 3 8、C D 4 4 v 6、癌胎児性抗原 (C E A)、上皮細胞接着分子 (E P C A M)、B 7 H 3 (C D 2 7 6)、K I T (C D 1 1 7)、インターロイキン - 1 3 受容体サブユニットアルファ - 2、メソセリン、インターロイキン 1 1 受容体アルファ (I L - 1 1 R a)、前立腺幹細胞抗原 (P S C A)、プロテアーゼセリン 2 1、血管内皮成長因子受容体 2 (V E G F R 2)、ルイス (Y) 抗原、C D 2 4、血小板由来成長因子受容体ベータ (P D G F R - ベータ)、ステージ特異的胚性抗原 - 4 (S S E A - 4)、C D 2 0、葉酸受容体アルファ、H E R 2、H E R 3、ムチン 1、細胞表面関連 (M U C 1)、表皮成長因子受容体 (E G F R)、神経細胞接着分子 (N C A M)、プロスターゼ、前立腺酸性ホスファターゼ (P A P)、伸長因子 2 突然変異 (E L F 2 M)、エフリン B 2、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ (F A P)、インスリン様成長因子 1 受容体 (I G F - I 受容体)、炭酸アンヒドラーゼ I X (C A I X)、プロテアソーム (プロソーム、マクロペイン) サブユニット、ベータタイプ、9 (L M P 2)、糖タンパク質 1 0 0 (g p 1 0 0)、ブレークポイントクラスター領域 (B C R) 及びアベルソンマウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモ

10

20

30

40

50

ログ1 (AbL) からなる癌遺伝子融合タンパク質 (bcra b l)、チロシナーゼ、エフリンA型受容体2 (EphA2)、フコシルGM1、シアリルルイス接着分子 (sLe)、ガングリオシドGM3、トランスグルタミナーゼ5 (TGS5)、高分子量黒色腫関連抗原 (HMWMAA)、o-アセチル-GD2ガングリオシド (OAcGD2)、葉酸受容体ベータ、腫瘍内皮マーカー1 (TEM1/CD248)、腫瘍内皮マーカー7関連 (TEM7R)、クローディン6 (CLDN6)、クローディン18.2 (CLDN18.2)、甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR)、Gタンパク質共役型受容体クラスCグループ5、メンバーD (GPCR5D)、染色体Xオープンリーディングフレーム61 (CXORF61)、CD97、及びCD179aの群から選択される抗原に特異的な抗原結合ドメインを含む、本発明1032~1045のいずれかの環状RNAポリヌクレオチド。

10

[本発明1047]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、CD19に特異的な抗原結合ドメインを含むCARを含む、本発明1032~1046のいずれかの環状RNAポリヌクレオチド。

[本発明1048]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、CD28、4-1BB、OX40、CD27、CD30、ICOS、GITR、CD40、CD2、SLAM、及びそれらの組み合わせの群から選択される共刺激ドメインを含むCARを含む、本発明1032~1047のいずれかの環状RNAポリヌクレオチド。

[本発明1049]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むCARを含む、本発明1032~1048のいずれかの環状RNAポリヌクレオチド。

20

[本発明1050]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、CH2CH3、CD28、及び/またはCD8スペーサードメインを含むCARを含む、本発明1032~1049のいずれかの環状RNAポリヌクレオチド。

[本発明1051]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、CD28またはCD8膜貫通ドメインを含むCARを含む、本発明1032~1050のいずれかの環状RNAポリヌクレオチド。

[本発明1052]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、

- a. 抗原結合ドメイン、
- b. スペーサードメイン、
- c. 膜貫通ドメイン、
- d. 共刺激ドメイン、及び
- e. 細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン

を含むCARを含む、本発明1032~1051のいずれかの環状RNAポリヌクレオチド。

30

[本発明1053]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、少なくとも2つの異なる抗原に対する抗原結合ドメインを含む多重特異性CARを含む、本発明1032~1052のいずれかの環状RNAポリヌクレオチド。

40

[本発明1054]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、及びTCRデルタの群から選択されるTCR複合体タンパク質を含む、本発明1032~1053のいずれかの環状RNAポリヌクレオチド。

[本発明1055]

天然ヌクレオチドからなる、本発明1032~1054のいずれかの環状RNAポリヌクレオチド。

[本発明1056]

50

前記発現配列が、コドン最適化されている、本発明 1032 の環状 RNA ポリヌクレオチド。

[本発明 1057]

同等の事前に最適化されたポリヌクレオチドに存在する少なくとも 1 つのマイクロ RNA 結合部位を欠くように最適化される、本発明 1032 ～ 1056 のいずれかの環状 RNA ポリヌクレオチド。

[本発明 1058]

同等の事前に最適化されたポリヌクレオチドに存在する少なくとも 1 つのエンドヌクレアーゼ感受性部位を欠くように最適化される、本発明 1032 ～ 1057 のいずれかの環状 RNA ポリヌクレオチド。

[本発明 1059]

同等の事前に最適化されたポリヌクレオチドに存在する少なくとも 1 つの RNA 編集感受性部位を欠くように最適化される、本発明 1032 ～ 1058 のいずれかの環状 RNA ポリヌクレオチド。

[本発明 1060]

同じ発現配列を有する同等の線状 RNA ポリヌクレオチドの機能的半減期よりも長い、ヒトにおけるインビボ機能的半減期を有する、本発明 1032 ～ 1059 のいずれかの環状 RNA ポリヌクレオチド。

[本発明 1061]

約 100 ヌクレオチド～約 10 キロベースの長さを有する、本発明 1032 ～ 1060 のいずれかの環状 RNA ポリヌクレオチド。

[本発明 1062]

少なくとも約 20 時間の機能的半減期を有する、本発明 1032 ～ 1061 のいずれかの環状 RNA ポリヌクレオチド。

[本発明 1063]

少なくとも約 20 時間のヒト細胞における治療効果の持続時間を有する、本発明 1032 ～ 1062 のいずれかの環状 RNA ポリヌクレオチド。

[本発明 1064]

同じ発現配列を含む同等の線状 RNA ポリヌクレオチドの治療効果の持続時間以上の、ヒト細胞における治療効果の持続時間を有する、本発明 1032 ～ 1063 のいずれかの環状 RNA ポリヌクレオチド。

[本発明 1065]

同じ発現配列を含む同等の線状 RNA ポリヌクレオチドの機能的半減期以上の、ヒト細胞における機能的半減期を有する、本発明 1032 ～ 1064 のいずれかの環状 RNA ポリヌクレオチド。

[本発明 1066]

以下の順序で、5' 二重鎖形成領域、第 1 の順列置換部位を有するアナベナ 3' グループ I イントロンフラグメント、内部リボソーム侵入部位 (IRES)、キメラ抗原受容体 (CAR) ポリペプチドをコードする発現配列、第 2 の順列置換部位を有するアナベナ 5' グループ I イントロンフラグメント、及び 3' 二重鎖形成領域を含む、DNA ベクター。

[本発明 1067]

前記 3' グループ I イントロンフラグメント及び 5' グループ I イントロンフラグメントが、アナベナグループ I イントロンフラグメントである、本発明 1066 の DNA ベクター。

[本発明 1068]

前記 3' イントロンフラグメント及び 5' イントロンフラグメントが、インタクトなイントロン内の L9a-5 順列置換部位によって定義される、本発明 1067 の DNA ベクター。

[本発明 1069]

前記 3' イントロンフラグメント及び 5' イントロンフラグメントが、インタクトなイントロン内の L8-2 順列置換部位によって定義される、本発明 1067 の DNA ベクター。

[本発明 1070]

前記 I R E S が、C V B 3 I R E S またはそのフラグメントもしくは変異体を含む、本発明 1 0 6 6 ～ 1 0 6 9 のいずれかの D N A ベクター。

[本発明 1 0 7 1]

前記 I R E S が、配列番号 6 5 に従う配列をコードする、本発明 1 0 7 0 の D N A ベクター。

[本発明 1 0 7 2]

前記 I R E S が、サリウイルス S Z 1 I R E S またはそのフラグメントもしくは変異体を含む、本発明 1 0 6 6 ～ 1 0 6 9 のいずれかの D N A ベクター。

[本発明 1 0 7 3]

前記 I R E S が、配列番号 6 3 に従う配列をコードする、本発明 1 0 7 2 の D N A ベクター。

10

[本発明 1 0 7 4]

前記環状 R N A ポリヌクレオチドが、以下の順序で、5' 二重鎖形成領域と、3' グループ I イントロンフラグメントと、内部リボソーム侵入部位 (I R E S) と、キメラ抗原受容体 (C A R) または T C R 複合体タンパク質をコードする発現配列と、5' グループ I イントロンフラグメントと、3' 二重鎖形成領域とを含む、本発明 1 0 6 6 ～ 1 0 7 3 のいずれかの D N A ベクター。

[本発明 1 0 7 5]

前記 5' 二重鎖形成領域及び 3' 二重鎖形成領域がそれぞれ、約 7 0 % G C ヌクレオチドを有する、本発明 1 0 7 4 の D N A ベクター。

20

[本発明 1 0 7 6]

前記 5' 二重鎖形成領域及び 3' 二重鎖形成領域がそれぞれ、約 3 0 ヌクレオチドの長さを有する、本発明 1 0 7 4 または本発明 1 0 7 5 の D N A ベクター。

[本発明 1 0 7 7]

第 1 の外部スペーサーを、前記 5' 二重鎖形成領域と前記 3' グループ I イントロンフラグメントとの間に、及び

第 2 の外部スペーサーを、前記 5' グループ I イントロンフラグメントと前記 3' 二重鎖形成領域との間に

含む、本発明 1 0 7 4 ～ 1 0 7 6 のいずれかの D N A ベクター。

[本発明 1 0 7 8]

30

前記第 1 及び第 2 の外部スペーサーがそれぞれ、約 1 0 ～ 約 6 0 ヌクレオチドの長さを有する、本発明 1 0 7 7 の D N A ベクター。

[本発明 1 0 7 9]

前記 5' 二重鎖形成領域が、3' グループ I イントロンフラグメントに直接隣接しており、前記 5' グループ I イントロンフラグメントが、3' 二重鎖形成領域に直接隣接している、本発明 1 0 7 4 ～ 1 0 7 8 のいずれかの D N A ベクター。

[本発明 1 0 8 0]

第 1 の内部スペーサーを、前記 3' グループ I イントロンフラグメントと前記 I R E S との間に、及び

第 2 の内部スペーサーを、前記発現配列と前記 5' グループ I イントロンフラグメントとの間に

40

含む、本発明 1 0 6 6 ～ 1 0 7 9 のいずれかの D N A ベクター。

[本発明 1 0 8 1]

前記第 1 及び第 2 の内部スペーサーがそれぞれ、約 1 0 ～ 約 6 0 ヌクレオチドの長さを有する、本発明 1 0 8 0 の D N A ベクター。

[本発明 1 0 8 2]

前記 C A R または T C R 複合体タンパク質が、C D 1 9、C D 1 2 3、C D 2 2、C D 3 0、C D 1 7 1、C S - 1、C 型レクチン様分子 - 1、C D 3 3、上皮成長因子受容体変異体 I I I (E G F R v I I I)、ジシアロガングリオシド G D 2、ジサロガングリオシド G D 3、T N F 受容体ファミリーメンバー、B 細胞成熟抗原 (B C M A)、T n 抗原

50

((T n A g) または (G a I N A c a - S e r / T h r)) 、前立腺特異的膜抗原 (P S M A) 、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体 1 (R O R 1) 、 F m s 様チロシンキナーゼ 3 (F L T 3) 、腫瘍関連糖タンパク質 7 2 (T A G 7 2) 、 C D 3 8 、 C D 4 4 v 6 、癌胎児性抗原 (C E A) 、上皮細胞接着分子 (E P C A M) 、 B 7 H 3 (C D 2 7 6) 、 K I T (C D 1 1 7) 、インターロイキン-13 受容体サブユニットアルファ-2、メソセリン、インターロイキン 11 受容体アルファ (I L - 1 1 R a) 、前立腺幹細胞抗原 (P S C A) 、プロテアーゼセリン 2 1 、血管内皮成長因子受容体 2 (V E G F R 2) 、ルイス (Y) 抗原、 C D 2 4 、血小板由来成長因子受容体ベータ (P D G F R - ベータ) 、ステージ特異的胚性抗原-4 (S S E A - 4) 、 C D 2 0 、葉酸受容体アルファ、 H E R 2 、 H E R 3 、ムチン 1 、細胞表面関連 (M U C 1) 、表皮成長因子受容体 (E G F R) 、神経細胞接着分子 (N C A M) 、プロスターゼ、前立腺酸性ホスファターゼ (P A P) 、伸長因子 2 突然変異 (E L F 2 M) 、エフリン B 2 、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ (F A P) 、インスリン様成長因子 1 受容体 (I G F - I 受容体) 、炭酸アンヒドラーゼ I X (C A I X) 、プロテアソーム (プロソーム、マクロペイン) サブユニット、ベータタイプ、 9 (L M P 2) 、糖タンパク質 1 0 0 (g p 1 0 0) 、ブレードポイントクラスター領域 (B C R) 及びアベルソンマウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ 1 (A b l) からなる癌遺伝子融合タンパク質 (b c r - a b l) 、チロシナーゼ、エフリン A 型受容体 2 (E p h A 2) 、フコシル G M 1 、シアリルルイス接着分子 (s L e) 、ガングリオシド G M 3 、トランスグルタミナーゼ 5 (T G S 5) 、高分子量黒色腫関連抗原 (H M W M A A) 、 o - アセチル - G D 2 ガングリオシド (O A c G D 2) 、葉酸受容体ベータ、腫瘍内皮マーカー 1 (T E M 1 / C D 2 4 8) 、腫瘍内皮マーカー 7 関連 (T E M 7 R) 、クローディン 6 (C L D N 6) 、クローディン 1 8 . 2 (C L D N 1 8 . 2) 、甲状腺刺激ホルモン受容体 (T S H R) 、 G タンパク質共役型受容体クラス C グループ 5 、メンバー D (G P R C 5 D) 、染色体 X オープンリーディングフレーム 6 1 (C X O R F 6 1) 、 C D 9 7 、及び C D 1 7 9 a の群から選択される抗原に特異的な抗原結合ドメインを含む、本発明 1 0 6 6 ~ 1 0 8 1 のいずれかの DNA ベクター。

[本発明 1 0 8 3]

前記 C A R または T C R 複合体タンパク質が、 C D 1 9 に特異的な抗原結合ドメインを含む C A R を含む、本発明 1 0 6 6 ~ 1 0 8 2 のいずれかの DNA ベクター。

[本発明 1 0 8 4]

前記 C A R または T C R 複合体タンパク質が、 C D 2 8 、 4 - 1 B B 、 O X 4 0 、 C D 2 7 、 C D 3 0 、 I C O S 、 G I T R 、 C D 4 0 、 C D 2 、 S L A M 、及びそれらの組み合わせの群から選択される共刺激ドメインを含む C A R を含む、本発明 1 0 6 6 ~ 1 0 8 3 のいずれかの DNA ベクター。

[本発明 1 0 8 5]

前記 C A R または T C R 複合体タンパク質が、 C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む C A R を含む、本発明 1 0 6 6 ~ 1 0 8 4 のいずれかの DNA ベクター。

[本発明 1 0 8 6]

前記 C A R または T C R 複合体タンパク質が、 C H 2 C H 3 、 C D 2 8 、及び/または C D 8 スペーサードメインを含む C A R を含む、本発明 1 0 6 6 ~ 1 0 8 5 のいずれかの DNA ベクター。

[本発明 1 0 8 7]

前記 C A R または T C R 複合体タンパク質が、 C D 2 8 または C D 8 膜貫通ドメインを含む C A R を含む、本発明 1 0 6 6 ~ 1 0 8 6 のいずれかの DNA ベクター。

[本発明 1 0 8 8]

前記 C A R または T C R 複合体タンパク質が、

- a. 抗原結合ドメイン、
- b. スペーサードメイン、
- c. 膜貫通ドメイン、
- d. 共刺激ドメイン、及び

10

20

30

40

50

e. 細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン

を含むCARを含む、本発明1066～1087のいずれかのDNAベクター。

[本発明1089]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、少なくとも2つの異なる抗原に対する抗原結合ドメインを含む多重特異性CARを含む、本発明1066～1088のいずれかのDNAベクター。

[本発明1090]

前記CARまたはTCR複合体タンパク質が、TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、及びTCRデルタの群から選択されるTCR複合体タンパク質を含む、本発明1066～1089のいずれかのDNAベクター。

[本発明1091]

以下の順序で、3'グループイントロンフラグメントと、内部リボソーム侵入部位(IRES)と、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR複合体タンパク質をコードする発現配列と、5'グループイントロンフラグメントとを含む、環状RNAポリヌクレオチドを含む、真核細胞。

[本発明1092]

ヒト細胞を含む、本発明1091の真核細胞。

[本発明1093]

免疫細胞を含む、本発明1091または1092の真核細胞。

[本発明1094]

T細胞を含む、本発明1091～1093のいずれかの真核細胞。

[本発明1095]

以下の順序で、3'グループイントロンフラグメントと、内部リボソーム侵入部位(IRES)と、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR複合体タンパク質をコードする発現配列と、5'グループイントロンフラグメントとを含む、環状RNAポリヌクレオチドを含む、真核細胞の集団であって、

前記環状RNAポリヌクレオチドによってコードされる前記CARまたはTCR複合体タンパク質をその細胞表面上に発現する、前記真核細胞の集団。

[本発明1096]

前記細胞の集団が、NK細胞、NKT細胞、マクロファージ、樹状細胞、アルファベータT細胞、ガンマデルタT細胞、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1095の真核細胞の集団。

[本発明1097]

前記細胞の集団が、T細胞を含む、本発明1095または1096の真核細胞の集団。

[本発明1098]

前記集団が、CD3+T細胞を含む、本発明1097の真核細胞の集団。

[本発明1099]

前記集団が、CD4+T細胞を含む、本発明1097の真核細胞の集団。

[本発明1100]

前記集団が、CD8+T細胞を含む、本発明1097の真核細胞の集団。

[本発明1101]

その必要があるヒト対象においてがんを処置するのに有効な量の、本発明1095～1100のいずれかの真核細胞の集団。

[本発明1102]

前記細胞の集団が、同じCARをコードする線状RNAを含む真核細胞の同等の集団よりも効果的にまたはより長く腫瘍細胞を死滅させる、本発明1095～1101のいずれかの真核細胞の集団。

[本発明1103]

真核細胞の集団を作製する方法であって、

以下の順序で、3'グループイントロンフラグメントと、内部リボソーム侵入部位(I

10

20

30

40

50

RES)と、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR複合体タンパク質をコードする発現配列と、5'グループイントロンフラグメントとを含む環状RNAポリヌクレオチドを含む輸送ビヒクルを、前記集団内の細胞と接触させる工程を含み、

前記輸送ビヒクルが、(i)イオン化可能脂質、(ii)構造脂質、及び(iii)PEG修飾脂質を含み、

前記輸送ビヒクルが、前記環状RNAポリヌクレオチドをヒト免疫細胞に送達することができ、その結果、前記CARが前記ヒト免疫細胞において翻訳され、前記ヒト免疫細胞の表面上で発現される、

前記方法。

[本発明1104]

その必要がある対象を処置する方法であって、

a.以下の順序で、3'グループイントロンフラグメントと、内部リボソーム侵入部位(IRES)と、キメラ抗原受容体(CAR)またはTCR複合体タンパク質をコードする発現配列と、5'グループイントロンフラグメントとを含む、環状RNAポリヌクレオチド、ならびに

b.(i)イオン化可能脂質、(ii)構造的脂質、及び(iii)PEG修飾脂質を含む、輸送ビヒクル

を含む、治療有効量の医薬組成物を投与する工程を含み、

前記輸送ビヒクルが、前記環状RNAポリヌクレオチドをヒト免疫細胞に送達することができ、その結果、前記CARが前記ヒト免疫細胞において翻訳され、前記ヒト免疫細胞の表面上で発現される、

前記方法。

[本発明1105]

前記対象が、急性リンパ球性癌；急性骨髄性白血病(AML)；肺泡横紋筋肉腫；膀胱癌(例えば、膀胱癌腫)；骨癌；脳癌(例えば、髄芽細胞腫)；乳癌；肛門、肛門管、または肛門直腸のがん；眼のがん；肝内胆管のがん；関節のがん；首、胆嚢、または胸膜のがん；鼻、鼻腔、または中耳のがん；口腔のがん；外陰部のがん；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性癌；結腸癌；食道癌；子宮頸癌；線維肉腫；消化管カルチノイド腫瘍；頭頸部癌(例えば、頭頸部扁平上皮癌)；ホジキンリンパ腫；下咽頭癌；腎臓癌；喉頭癌；白血病；液性腫瘍；肝臓癌；肺癌(例えば、非小細胞肺癌及び肺腺癌)；リンパ腫；中皮腫；肥満細胞腫；黒色腫；多発性骨髄腫；上咽頭癌；非ホジキンリンパ腫；B-慢性リンパ球性白血病；有毛細胞白血病；急性リンパ球性白血病(ALL)；及びバーキットリンパ腫；卵巣癌；膵臓癌；腹膜、大網、及び腸間膜の癌；咽頭癌；前立腺癌；直腸癌；腎癌；皮膚癌；小腸癌；軟部組織癌；固形腫瘍；滑膜肉腫；胃癌；精巣癌；甲状腺癌；ならびに尿管癌の群から選択されるがんを有する、本発明1104の方法。

[本発明1106]

内部リボソーム侵入部位(IRES)、キメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチドをコードする発現配列、及び少なくとも1つの自己環状化エレメントを含む、RNAポリヌクレオチド。

[本発明1107]

5'二重鎖形成領域、第1の順列置換部位を有するアナベナ3'グループイントロンフラグメント、内部リボソーム侵入部位(IRES)、キメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチドをコードする発現配列、第2の順列置換部位を有するアナベナ5'グループイントロンフラグメント、及び3'二重鎖形成領域を含む、本発明1106のRNAポリヌクレオチド。

[本発明1108]

5'二重鎖形成領域、第1の順列置換部位、内部リボソーム侵入部位(IRES)、キメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチドをコードする発現配列、第2の順列置換部位、及び3'二重鎖形成領域を含む、本発明1106または1107のRNAポリヌクレオチド。

[本発明1109]

10

20

30

40

50

前記自己環状化エレメントが、グループIイントロンフラグメントである、本発明1106～1108のいずれかのRNAポリヌクレオチド。

[本発明1110]

3'グループIイントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントを含む、本発明1108または1109のRNAポリヌクレオチド。

[本発明1111]

前記3'グループIイントロンフラグメント及び5'グループIイントロンフラグメントが、アナベナグループIイントロンフラグメントである、本発明1110のRNAポリヌクレオチド。

[本発明1112]

前記3'イントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントが、インタクトなイントロン内のL9a-5順列置換部位によって定義される、本発明1111のRNAポリヌクレオチド。

[本発明1113]

前記3'イントロンフラグメント及び5'イントロンフラグメントが、インタクトなイントロン内のL8-2順列置換部位によって定義される、本発明1111のRNAポリヌクレオチド。

[本発明1114]

酵素の非存在下で環状化することができる、本発明1110～1113のいずれかのRNAポリヌクレオチド。

[本発明1115]

天然ヌクレオチドからなる、本発明1106～1114のいずれかのRNAポリヌクレオチド。

[本発明1116]

本発明1106～1115のいずれかのRNAポリヌクレオチドを合成するのに好適なDNAベクター。

[本発明1117]

前記環状RNAポリヌクレオチドが、非脂質ポリマーコアシェルナノ粒子において標的細胞に送達される、本発明1032～1065のいずれかの環状RNAポリヌクレオチド。

【0050】

参照による組み込み

この本明細書に言及される全ての刊行物、特許及び特許出願は、各個別の刊行物、特許、または特許出願が、明確かつ個別に参照により本明細書に組み込まれることが示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】 ガウシアルシフェラーゼ発現配列及びさまざまなIRES配列を含む環状RNAを用いたトランスフェクションから24時間後のHEK293(A)、HepG2(B)、または1C1C7(C)細胞の上清における発光を示す。

【図2】 ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び異なる長さを有するさまざまなIRES配列を含む環状RNAを用いたトランスフェクションから24時間後のHEK293(A)、HepG2(B)、1C1C7(C)細胞の上清における発光を示す。

【図3】 発光によって測定された、3日間にわたるHepG2(3A)または1C1C7(3B)細胞における選択されたIRESコンストラクトの安定性を示す。

【図4】 A及びBは、細胞上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光によって測定された、Jurkat細胞における選択されたIRESコンストラクトからのタンパク質発現を示す。

【図5】 A及びBは、発光によって測定された、3日間にわたるJurkat細胞における選択されたIRESコンストラクトの安定性を示す。

【図6】 ガウシアルシフェラーゼをコードする修飾線状、未精製環状、または精製環状R

10

20

30

40

50

RNAの24時間発光(A)または3日間にわたる相対発光(B)の比較を示す。

【図7】修飾線状、未精製環状、または精製環状RNAを用いたJurkat細胞のエレクトロポレーション後の、IFN γ (A)、IL-6(B)、IL-2(C)、RIG-I(D)、IFN- β 1(E)、及びTNF α (F)の転写産物誘導を示す。

【図8】ヒト初代単球(A)及びマクロファージ(B及びC)におけるガウシアルシフェラーゼをコードする環状RNA及び修飾線状RNAの発光の比較を示す。

【図9】ガウシアルシフェラーゼ発現配列及びさまざまなIRES配列を含む環状RNAを用いた形質導入後の初代T細胞の上清における3日間にわたる相対発光(A)または24時間発光(B)を示す。

【図10】ガウシアルシフェラーゼ発現配列を含む環状RNAまたは修飾線状RNAを用いた形質導入後の初代T細胞の上清における24時間発光(A)、または3日間にわたる相対発光(B)、及びPBMCにおける24時間発光(C)を示す。

【図11】異なる順列置換部位を有するRNAコンストラクトのHPLCクロマトグラム(A)及び環状化効率(B)を示す。

【図12】異なるイントロン及び／または順列置換部位を有するRNAコンストラクトのHPLCクロマトグラム(A)及び環状化効率(B)を示す。

【図13】相同アームを伴うまたは伴わない3つのRNAコンストラクトのHPLCクロマトグラム(A)及び環状化効率(B)を示す。

【図14】相同アームを伴わない、またはさまざまな長さ及びGC含量を有する相同アームを伴う3つのRNAコンストラクトの環状化効率を示す。

【図15】A及びBは、スプライシング効率の改善に対する強い相同アームの寄与、選択されたコンストラクトにおける環状化効率及びニッキング間の関係、ならびに環状化効率の改善を示すと仮定された順列置換部位及び相同アームの組み合わせを示すHPLC HPLCクロマトグラムを示す。

【図16】モックエレクトロポレーションした(左)またはCARをコードする環状RNAでエレクトロポレーション(右)し、GFP及びホタルシフェラーゼを発現するRaji細胞と共培養したT細胞の蛍光画像を示す。

【図17】モックエレクトロポレーションした(上)またはCARをコードする環状RNAでエレクトロポレーション(下)し、GFP及びホタルシフェラーゼを発現するRaji細胞と共培養したT細胞の明視野(左)、蛍光(中心)、及びオーバーレイ(右)画像を示す。

【図18】モックエレクトロポレーションした、または異なるCAR配列をコードする環状RNAでエレクトロポレーションしたT細胞によるRaji標的細胞の特異的溶解を示す。

【図19】Aは、ガウシアルシフェラーゼ発現配列及びさまざまなIRES配列を含む線状または環状RNAを用いた形質導入から24時間後のJurkat細胞(左)または休止初代ヒトCD3+T細胞(右)の上清における発光を示す。Bは、3日間にわたる相対発光を示す。

【図20】修飾線状、未精製環状、または精製環状RNAを用いたヒトCD3+T細胞のエレクトロポレーション後のIFN- β 1(A)、RIG-I(B)、IL-2(C)、IL-6(D)、IFN γ (E)、及びTNF α (F)の転写産物誘導を示す。

【図21】Aは、ホタル発光の検出によって決定した、CARをコードするcircRNAでエレクトロポレーションしたヒト初代CD3+T細胞によるRaji標的細胞の特異的溶解を示す。Bは、CAR配列をコードする異なる量の環状または線状RNAでエレクトロポレーションした24時間後のIFN γ 転写産物誘導を示す。

【図22】A及びBは、ホタルの発光の検出によって決定した、異なるE:T比にてCARをコードする環状または線状RNAでエレクトロポレーションしたヒト初代CD3+T細胞による標的細胞または非標的細胞の特異的溶解を示す。

【図23】エレクトロポレーションの1、3、5、及び7日後での、CARをコードするRNAでエレクトロポレーションしたヒトCD3+T細胞による標的細胞の特異的溶解を

10

20

30

40

50

示す。

【図24】CD19またはBCMA標的CARをコードする環状RNAでエレクトロポレーションしたヒトCD3+T細胞による標的細胞の特異的溶解を示す。

【図25】相同アーム設計のための前駆体RNA二次構造のRNAFold予測を示す。塩基が濃いほど、塩基対形成の確率が高いことを示す。相同アームがなければ、前駆体分子の末端間で塩基対形成は生じないと予測される。

【図26】前駆体RNA環状化のアガロースゲル確認を示す。C：環状化条件に供された前駆体RNA（強い相同アームを有する）。C+R：レーンC、RNase Rで消化。C+R+H：レーンC+R、オリゴヌクレオチド誘導RNase Hで消化。U：環状化条件に供されない前駆体RNA。U+H：レーンU、オリゴヌクレオチド誘導RNase Hで消化。

10

【図27】図26からのレーンC+Rに示されている試料のスプライスジャンクションにわたるRT-PCRのサンガーシーケンシング出力を示す。

【図28】設計されたスペーサーとの関連における前駆体RNAの二次構造のRNAFold予測を示す。リボザイム機能にとって潜在的に重要な二次構造は、黒色矢印によって特定する。

【図29】スプライシングに対するスペーサーの効果を実証するアガロースゲルを示す。（-）：スペーサーなし。D：破壊的スペーサー。P1：許容スペーサー1。P2：許容スペーサー2。内部相同領域設計に関する前駆体RNA二次構造のcRNAFold予測。有意な内部相同性（アナベナ1.0）の欠如及び導入された内部相同性（アナベナ2.0）を黒色矢印によって示す。スプライシングリボザイムを含有する相同アーム及び内部相同領域間の領域として示されるスプライシングバブル。

20

【図30】操作された自己スプライシング前駆体RNA設計のエレメントを示す概略図である。

【図31】CVB3-GLuc-pAC circRNAまたは修飾もしくは非修飾線状GLuc mRNAを用いたトランスフェクションから24時間後のHEK293（左、黒色輪郭）及びHeLa（右、灰色輪郭）細胞の上清における発光を示す（n=4 HEK293、n=3 HeLa）。

【図32】CVB3-GLuc-pAC circRNAまたは修飾もしくは非修飾線状GLuc mRNAを用いたトランスフェクションから24時間後に開始し、6日間継続する、HEK293細胞の上清における発光を示す（n=4）。

30

【図33】前駆体RNA設計及び自己スプライシングの概要を示す。網掛けは、本明細書に記載のRNAの異なる領域を示す。

【図34】異なるcircRNA調製物（+RNase R、RNase Rで消化したのみの未精製circRNA；+HPLC、未精製circRNAをHPLCで精製した後、RNase Rで消化；+Phos、未精製circRNAをHPLCで精製し、ホスファターゼで処理した後、RNase Rで消化）でトランスフェクトしたA549細胞からの細胞生存率、circRNA発現安定性、及びサイトカイン放出を示す。トランスフェクションから3日後に細胞生存率を評価した。サイトカイン放出は、トランスフェクションから24時間後に評価した（データは、平均+SDとして表した；n=3；*p<0.05；ND、検出されず）。

40

【図35】TLR実験のために導入及び使用されたRNAの概略図を示す。線状化circRNAは、イントロン及び相同アームの両方を包含する欠失のために、スプライシングされたcircRNAと同じ配列エレメントを全て含有する。

【図36】4人のドナーから単離され、circRNAでエレクトロポレーションした初代ヒトT細胞上での抗CD19 CARの表面発現を示す。

【図37】Aは、circRNAでエレクトロポレーションした生T細胞のCAR+の割合を示す。Bは、図36の4人のヒトドナーにおけるCD4及びCD8陽性T細胞の割合を示す。

【図38】ルシフェラーゼを発現するCD19+標的細胞及びCD19-非標的細胞の

50

生物発光を低減する上で、モックエレクトロポレーションした、または抗CD19 CARをコードするcircRNAもしくは線状RNAでエレクトロポレーションしたT細胞の有効性を示す。

【図39】異なるIRESを有する抗CD19 CARをコードするcircRNAでエレクトロポレーションし、エレクトロポレーションから5日後(A)または1日後(B)にルシフェラーゼ発現RajiまたはK562細胞と共培養したT細胞の有効性を示す。

(Oro-B1=circキムリア; CVB3 IRES、Oro-152=circキムリア; サリウイルスSZ1 IRES、L9a-5 順列置換部位)

【図40】抗CD19 CARをコードするcircRNAでエレクトロポレーションしたT細胞による標的細胞及び非標的細胞の溶解を示す。Aは、抗CD19 CAR発現配列及びCVB3 IRESまたはサリウイルスSZ1 IRESを有するcircRNAでエレクトロポレーションした初代ヒトT細胞によるCD19+Raji細胞及びCD19-K562細胞の溶解を示す。Bは、抗CD19 CAR発現配列を有する異なる比率のcircRNAまたは線状mRNAでエレクトロポレーションした初代ヒトT細胞によるCD19+Raji細胞及びCD19-K562細胞の溶解を示す。Cは、抗CD19 CAR発現配列を有するcircRNAでエレクトロポレーションした異なる比率の初代ヒトT細胞によるCD19+Raji細胞及びCD19-K562細胞の溶解を示す。

【図41】抗CD19 CARをコードするレンチウイルスで形質導入したT細胞と比較した、CD19+Raji細胞の溶解における抗CD19 CARをコードするcircRNAでエレクトロポレーションしたT細胞の有効性を示す。Aは、10個のRaji細胞対1個のT細胞の比率にて、抗CD19 CARをコードするレンチウイルスで形質導入したT細胞と比較した、CD19+Raji細胞の溶解における抗CD19 CARをコードするcircRNAの特異的溶解を示す。Bは、モックエレクトロポレーションした、または抗CD19 CARをコードするレンチウイルスもしくはcircRNAでエレクトロポレーションした抗CD19 CAR発現T細胞の割合(%)を示す。Cは、CD19+Raji細胞の存在下または非存在下で共培養した抗CD19 CARをコードするcircRNAでエレクトロポレーションしたT細胞におけるインターフェロンガンマmRNAの誘導を示す。(Oro-B1=circキムリア; CVB3 IRES、Oro-B6=linキムリア)

【図42】抗CD19 CARをコードするcircRNAまたは線状mRNAでエレクトロポレーションした初代ヒトCD3+T細胞における抗CD19 CAR発現の安定性を示す。

【図43】共培養実験でルシフェラーゼ発現Raji細胞の溶解におけるCARをコードするcircRNAでエレクトロポレーションしたTHP-1単球の有効性を示す。

【図44】CD19+A20細胞及びCD19-K562細胞の溶解における抗マウスCD19 CARをコードするcircRNAでエレクトロポレーションしたT細胞の有効性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0052】

詳細な説明

環状RNAを含む医薬組成物及び輸送ビヒクル、例えば、脂質ナノ粒子を本明細書に提供する。本明細書に提供する環状RNAは、細胞に、輸送ビヒクル、例えば、ナノ粒子、または輸送ビヒクルを含む組成物にて、送達及び／または標的化され得る。一部の実施形態では、環状RNAはまた、対象に、輸送ビヒクルまたは輸送ビヒクルを含む組成物にて送達され得る。一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、ナノ粒子である。一部の実施形態では、ナノ粒子は、脂質ナノ粒子、非脂質ポリマーコアシェルナノ粒子、または生分解性ナノ粒子である。一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、1つまたは複数のイオン化可能脂質、PEG修飾脂質、ヘルパー脂質、及び／または構造脂質を含む。

【0053】

一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、環状RNAを封入し、イオン化可能脂質、構造

10

20

30

40

50

脂質、及び P E G 修飾脂質を含む。一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、環状 R N A を封入し、イオン化可能脂質、構造脂質、P E G 修飾脂質、及びヘルパー脂質を含む。

【 0 0 5 4 】

理論に拘束されることを望まないが、本明細書に記載の輸送ビヒクルは、封入された環状 R N A を分解から保護し、インビボ及びインビトロで標的細胞への環状 R N A の効果的な送達を提供すると考えられる。

【 0 0 5 5 】

本開示の実施形態は、製剤中の成分脂質のそれぞれのモル比に従って記載された脂質組成物を提供する。一実施形態では、イオン化可能脂質のモル%は、約 1 0 モル%～約 8 0 モル%であり得る。一実施形態では、イオン化可能脂質のモル%は、約 2 0 モル%～約 7 0 モル%であり得る。一実施形態では、イオン化可能脂質のモル%は、約 3 0 モル%～約 6 0 モル%であり得る。一実施形態では、イオン化可能脂質のモル%は、約 3 5 モル%～約 5 5 モル%であり得る。一実施形態では、イオン化可能脂質のモル%は、約 4 0 モル%～約 5 0 モル%であり得る。一部の実施形態では、輸送ビヒクルバッチのイオン化可能脂質モル%は、標的モル%の $\pm 3 0 \%$ 、 $\pm 2 5 \%$ 、 $\pm 2 0 \%$ 、 $\pm 1 5 \%$ 、 $\pm 1 0 \%$ 、 $\pm 5 \%$ 、または $\pm 2 . 5 \%$ であるだろう。ある特定の実施形態では、輸送ビヒクルのロット間変動は、1 5 %未満、1 0 %未満または5 %未満であるだろう。

【 0 0 5 6 】

一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、約 1 モル%～約 5 0 モル%であり得る。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、約 2 モル%～約 4 5 モル%であり得る。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、約 3 モル%～約 4 0 モル%であり得る。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、約 4 モル%～約 3 5 モル%であり得る。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、約 5 モル%～約 3 0 モル%であり得る。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、約 1 0 モル%～約 2 0 モル%であり得る。一部の実施形態では、輸送ビヒクルバッチのヘルパー脂質モル%は、標的モル%の $\pm 3 0 \%$ 、 $\pm 2 5 \%$ 、 $\pm 2 0 \%$ 、 $\pm 1 5 \%$ 、 $\pm 1 0 \%$ 、 $\pm 5 \%$ 、または $\pm 2 . 5 \%$ であるだろう。

【 0 0 5 7 】

一実施形態では、構造脂質のモル%は、約 1 0 モル%～約 8 0 モル%であり得る。一実施形態では、構造脂質のモル%は、約 2 0 モル%～約 7 0 モル%であり得る。一実施形態では、構造脂質のモル%は、約 3 0 モル%～約 6 0 モル%であり得る。一実施形態では、構造脂質のモル%は、約 3 5 モル%～約 5 5 モル%であり得る。一実施形態では、構造脂質のモル%は、約 4 0 モル%～約 5 0 モル%であり得る。一部の実施形態では、輸送ビヒクルバッチの構造脂質モル%は、標的モル%の $\pm 3 0 \%$ 、 $\pm 2 5 \%$ 、 $\pm 2 0 \%$ 、 $\pm 1 5 \%$ 、 $\pm 1 0 \%$ 、 $\pm 5 \%$ 、または $\pm 2 . 5 \%$ であるだろう。

【 0 0 5 8 】

一実施形態では、P E G 修飾脂質のモル%は、約 0 . 1 モル%～約 1 0 モル%であり得る。一実施形態では、P E G 修飾脂質のモル%は、約 0 . 2 モル%～約 5 モル%であり得る。一実施形態では、P E G 修飾脂質のモル%は、約 0 . 5 モル%～約 3 モル%であり得る。一実施形態では、P E G 修飾脂質のモル%は、約 1 モル%～約 2 モル%であり得る。一実施形態では、P E G 修飾脂質のモル%は、約 1 . 5 モル%であり得る。一部の実施形態では、輸送ビヒクルバッチの P E G 修飾脂質モル%は、標的モル%の $\pm 3 0 \%$ 、 $\pm 2 5 \%$ 、 $\pm 2 0 \%$ 、 $\pm 1 5 \%$ 、 $\pm 1 0 \%$ 、 $\pm 5 \%$ 、または $\pm 2 . 5 \%$ であるだろう。

【 0 0 5 9 】

本明細書に開示する化合物のうちの 1 つまたは複数を含む医薬組成物、及び特に輸送ビヒクルも企図する。ある特定の実施形態では、かかる輸送ビヒクルは、本明細書に開示する P E G 修飾脂質、イオン化可能脂質、ヘルパー脂質及び／または構造脂質のうちの 1 つまたは複数を含む。本明細書に開示する化合物のうちの 1 つまたは複数を含み、1 つまたは複数の追加の脂質をさらに含む、輸送ビヒクルも企図する。ある特定の実施形態では、かかる輸送ビヒクルは、環状 R N A をロードするか、さもなければ封入する。

【 0 0 6 0 】

本発明の輸送ビヒクルは、環状RNAを封入する。ある特定の実施形態では、本発明の化合物または医薬組成物及びリポソーム組成物によって封入されるポリヌクレオチドには、タンパク質または酵素をコードするRNA（例えば、例として、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）をコードするcircRNA）が含まれる。本発明は、例えば、国際出願番号PCT/US2010/058457及び2011年6月8日出願された米国仮特許出願第61/494,881号（これらの教示は、両方とも参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に開示されるような機能的酵素またはタンパク質の産生（及びある特定の例では、排泄）のために標的細胞によって発現されることができる治療剤としてのかかるポリヌクレオチドの使用を企図する。例えば、ある特定の実施形態では、標的細胞による1つまたは複数のポリヌクレオチドの発現時に、対象が欠損している機能的酵素またはタンパク質（例えば、尿素回路酵素またはリソソーム蓄積障害に関連する酵素）の産生が観察され得る。別の例として、輸送ビヒクルによって封入された環状RNAは、T細胞受容体タンパク質またはキメラ抗原受容体（CAR）をコードし得る。

【0061】

本明細書に記載の機能的タンパク質をコードする環状RNA及び輸送ビヒクル含む有効量の組成物を対象に投与することにより対象の疾患を処置する方法も本明細書に提供する。一部の実施形態では、環状RNAは、輸送ビヒクル内に封入される。ある特定の実施形態では、かかる方法は、ポリヌクレオチドの発現を向上させる（例えば、増加させる）及び／または1つもしくは複数の標的細胞及び組織（例えば、肝細胞）における機能的ポリペプチド産物の産生及び分泌を増加させる可能性がある。一般に、かかる方法は、標的細胞を、circRNAを含むまたはそうでなければ封入する1つまたは複数の化合物及び／または輸送ビヒクルと接触させることを含む。

【0062】

ある特定の実施形態では、輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）は、標的細胞の（例えば、環状RNAの）トランスフェクションを容易にするそれらの能力に部分的に基づいて製剤化される。別の実施形態では、輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）は、環状RNAの標的細胞、組織または器官への送達を最適化するように選択及び／または調製され得る。例えば、標的細胞が肝細胞である場合、医薬組成物及び／またはリポソーム組成物の特性（例えば、サイズ、電荷及び／またはpH）は、かかる組成物（例えば、脂質ナノ粒子）を、標的細胞または器官に効果的に送達する、免疫クリアランスを低下させる、及び／または標的細胞もしくは器官での保持を容易にするように最適化され得る。あるいは、標的組織が中枢神経系である場合、輸送ビヒクルの選択及び調製は、血液脳関門の浸透性及び血液脳関門内での保持、及び／またはかかる組成物（例えば、脂質ナノ粒子）をかかる標的組織に（例えば、脳血管内投与を介して）直接送達する代替手段の使用を考慮しなければならない。ある特定の実施形態では、輸送ビヒクルは、血液脳関門を通過する封入された物質の輸送を容易にする作用物質（例えば、血液脳関門を破壊するまたはその透過性を改善し、それによって環状RNAの標的細胞への輸送を向上する作用物質）と組み合わせられ得る。本明細書に記載の輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）が、circRNAの標的細胞への導入を容易にすることができる一方で、医薬組成物を構成する脂質ナノ粒子のうちの1つまたは複数へのコポリマーとしてのポリカチオン（例えば、ポリレーリジン及びプロタミン）の添加は、一部の 경우에는、インビトロ及びインビボの両方で多くの細胞株において、いくつかのタイプの輸送ビヒクルのトランスフェクション効率を2〜28倍著しく向上することができる（N. J. Caplen, et al., Gene Ther. 1995; 2:603; S. Li, et al., Gene Ther. 1997; 4, 891を参照されたい。）。一部の実施形態では、標的細胞は、免疫細胞である。一部の実施形態では、標的細胞は、T細胞である。

【0063】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）は、複数の脂質成分（例えば、本明細書に開示する化合物のうちの1つまたは複数）を1つまたは複数のポリマー成分と組み合わせることによって調製される。例えば、脂質ナノ粒

子は、HGT4003、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2000を使用して調製され得る。脂質ナノ粒子は、例えば、HGT4001、DOPE及びDMG-PEG2000を含む、さまざまな比率の追加の脂質の組み合わせから構成され得る。脂質ナノ粒子を構成するイオン化可能脂質、ヘルパー脂質、構造脂質及び／またはPEG修飾脂質の選択、ならびにかかる脂質の相互の相対モル比は、選択された脂質（複数可）の特徴、意図される標的細胞または組織の性質、及び脂質ナノ粒子によって送達される物質またはポリヌクレオチドの特徴に基づく。追加の考慮事項には、例えば、アルキル鎖の飽和、ならびに選択された脂質（複数可）のサイズ、電荷、pH、pKa、融合性及び毒性が含まれる。

【0064】

本明細書に記載の輸送ビヒクルは、封入されたポリヌクレオチドが標的細胞に到達することを可能にし得る、または封入されたポリヌクレオチドが標的細胞もしくは器官に差別的に到達することを優先的に可能にし得る（例えば、輸送ビヒクルは、かかる輸送ビヒクルが投与される対象の肝臓または脾臓に集中し得る）。あるいは、輸送ビヒクルは、封入されたポリヌクレオチドの存在が望ましくない、または限られた有用性であり得る他の非標的細胞または器官への封入されたポリヌクレオチドの送達を制限し得る。

【0065】

ポリヌクレオチド、例えば、circRNAを、輸送ビヒクルにロードするまたは封入することは、かかるポリヌクレオチドを分解する酵素もしくは化学物質を含有し得る環境（例えば、血清）及び／またはかかるポリヌクレオチドの急速な排泄を引き起こすシステムもしくは受容体から、ポリヌクレオチドを保護するのに役立ち得る。したがって、一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、封入されたポリヌクレオチド（複数可）の安定性を、特にかかるポリヌクレオチドが曝露され得る環境に関して、向上することができる。

【0066】

ある特定の実施形態では、環状RNAを作製するためのベクターを本明細書に提供し、該ベクターは、5'二重鎖形成領域、3'グループエイントロンフラグメント、任意選択で第1のスペーサー、内部リボソーム侵入部位(IRES)、発現配列、任意選択で第2のスペーサー、5'グループエイントロンフラグメント、及び3'二重鎖形成領域を含む。一部の実施形態では、これらのエレメントは、上記の順序でベクター内に配置される。一部の実施形態では、ベクターは、内部5'二重鎖形成領域を3'グループエイントロンフラグメント及びIRES間に、ならびに内部3'二重鎖形成領域を発現配列及び5'グループエイントロンフラグメント間に、さらに含む。一部の実施形態では、内部二重鎖形成領域は、互いの間に二重鎖を形成することができるが、外部二重鎖形成領域とは形成できない。一部の実施形態では、内部二重鎖形成領域は、第1及び第2のスペーサーの一部である。追加の実施形態には、本明細書に提供するベクターを使用して作製された環状RNAポリヌクレオチドを含む環状RNAポリヌクレオチド、かかる環状RNAを含む組成物、かかる環状RNAを含む細胞、かかるベクター、環状RNA、組成物及び細胞を使用及び作製する方法が含まれる。

【0067】

一部の実施形態では、治療またはキメラ抗原受容体(CAR)もしくはT細胞受容体(TCR)複合体タンパク質などの有用なタンパク質の産生のための細胞への本明細書に提供する環状RNAポリヌクレオチドの投与を含む方法を本明細書に提供する。一部の実施形態では、本方法は、リボヌクレアーゼに対し環状RNAが耐性であるために、線状RNAよりも長い半減期を伴う真核細胞内での所望のポリペプチドの産生を提供することにおいて有利である。

【0068】

環状RNAポリヌクレオチドは、エキソヌクレアーゼを介した分解に必要な遊離端を欠いているため、同等の線状RNAと比較した場合、RNA分解のいくつかのメカニズムに対して耐性がもたらされ、半減期が長くなる。環状化により、一般に半減期が短いRNA

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチドの安定化が可能になり、さまざまな用途において外因性mRNAの全体的な有効性が改善する。ある実施形態では、真核細胞（例えば、ヒト細胞などの哺乳動物細胞）における本明細書に提供する環状RNAポリヌクレオチドの半減期は、少なくとも20時間（例えば、少なくとも80時間）である。

【0069】

1. 定義

本明細書で使用する場合、「circRNA」または「環状ポリリボヌクレオチド」または「環状RNA」という用語は、互換可能に使用され、共有結合を通して環状構造を形成するポリリボヌクレオチドを指す。

【0070】

本明細書で使用する場合、「3'グループイントロンフラグメント」という用語は、スプライス部位ジヌクレオチド及び任意選択で天然エクソン配列のストレッチを含む天然グループイントロンの3'近位端と75%以上の類似性を有する配列を指す。

【0071】

本明細書で使用する場合、「5'グループイントロンフラグメント」という用語は、スプライス部位ジヌクレオチド及び任意選択で天然エクソン配列のストレッチを含む天然グループイントロンの5'近位端と75%以上の類似性を有する配列を指す。

【0072】

本明細書で使用する場合、「順列置換部位」という用語は、イントロンの順列置換の前に切断が行われるグループイントロン内の部位を指す。この切断により、3'及び5'グループイントロンフラグメントが生成され、これらは、環状化される前駆体RNAのストレッチのいずれかの側に順列置換される。

【0073】

本明細書で使用する場合、「スプライス部位」という用語は、グループイントロンに部分的または完全に含まれ、その間でRNA環状化中にホスホジエステル結合が切断されるジヌクレオチドを指す。

【0074】

本明細書で使用する場合、「治療用タンパク質」という用語は、対象に、翻訳された核酸の形態で直接または間接的に投与された場合に、治療的、診断的、及び／または予防効果を有する、及び／または望ましい生物学的及び／または薬理学的効果を引き出す、任意のタンパク質を指す。

【0075】

本明細書で使用する場合、「免疫原性」という用語は、物質に対する免疫応答を誘導する可能性を指す。免疫応答は、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞が免疫原性物質に曝露された場合に誘導され得る。「非免疫原性」という用語は、物質に対する検出可能な閾値を超える免疫応答の欠如または非存在を指す。免疫応答は、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞が非免疫原性物質に曝露した場合には検出されない。一部の実施形態では、本明細書に提供するような非免疫原性環状ポリリボヌクレオチドは、免疫原性アッセイによって測定された場合、所定の閾値を超える免疫応答を誘導しない。一部の実施形態では、自然免疫応答は、生物の免疫系または特定のタイプの免疫細胞が本明細書に提供するような非免疫原性環状ポリリボヌクレオチドに曝露された場合には、検出されない。一部の実施形態では、適応免疫応答は、生物の免疫系または特定のタイプの免疫細胞が本明細書に提供するような非免疫原性環状ポリリボヌクレオチドに曝露された場合には、検出されない。

【0076】

本明細書で使用する場合、「環状化効率」という用語は、その線状出発物質と比較した、結果得られた環状ポリリボヌクレオチドの測定値を指す。

【0077】

本明細書で使用する場合、「翻訳効率」という用語は、リボヌクレオチド転写産物からのタンパク質またはペプチド産生の速度または量を指す。一部の実施形態では、翻訳効率

10

20

30

40

50

は、タンパク質またはペプチドをコードする転写産物の所与の量あたりに産生されるタンパク質またはペプチドの量として表すことができる。

【0078】

「ヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、その修飾形態、またはその類似体を指す。ヌクレオチドには、プリン、例えば、アデニン、ヒポキサンチン、グアニン、ならびにその誘導体及び類似体、ならびにピリミジン、例えば、シトシン、ウラシル、チミン、ならびにその誘導体及び類似体を含む種が含まれる。ヌクレオチド類似体には、塩基、糖及び／またはリン酸の化学構造に修飾を有するヌクレオチドが含まれ、それには、5'位ピリミジン修飾、8'位プリン修飾、シトシン環外アミンでの修飾、及び5-ブプロモ-ウラシルの置換；ならびに2'位糖修飾、例えば限定されないが、2'-OHがH、OR、R、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、またはCN（ここで、Rは、本明細書で定義するようなアルキル部分である）などの基によって置換されている糖修飾リボヌクレオチドが含まれるが、これに限定されない。ヌクレオチド類似体はまた、塩基、例えばイノシン、クエオシン、キサンチン；糖、例えば2'-メチルリボース；非天然ホスホジエステル連結、例えばメチルホスホン酸、ホスホロチオエート及びペプチド連結を伴うヌクレオチドを含むことを意図する。ヌクレオチド類似体には、5-メトキシウリジン、1-メチルシュードウリジン、及び6-メチルアデノシンが含まれる。

10

【0079】

「核酸」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書において互換可能に使用され、任意の長さ、例えば、約2塩基を超える、約10塩基を超える、約100塩基を超える、約500塩基を超える、1000塩基を超える、または最大で約10,000塩基以上の、ヌクレオチド、例えば、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドから構成されるポリマーを説明し、酵素的または合成的に産生され得（例えば、米国特許第5,948,902号及びそこに引用される参考文献に記載される通りである）、これは2つの天然に存在する核酸のものに類似した配列特異的様式で天然に存在する核酸とハイブリダイズする、例えば、ワトソン-クリック塩基対形成相互作用に参加することができる。天然に存在する核酸は、グアニン、シトシン、アデニン、チミン、及びウラシル（それぞれ、G、C、A、T、及びU）を含むヌクレオチドから構成される。

20

【0080】

本明細書で使用する場合、「リボ核酸」及び「RNA」という用語は、リボヌクレオチドから構成されるポリマーを意味する。

30

【0081】

本明細書で使用する場合、「デオキシリボ核酸」及び「DNA」という用語は、デオキシリボヌクレオチドから構成されるポリマーを意味する。

【0082】

「単離された」または「精製された」は、一般に、物質（例えば、一部の実施形態では、化合物、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド組成物、またはポリペプチド組成物）が、それが存在する試料のかなりのパーセント（例えば、1%を超える、2%を超える、5%を超える、10%を超える、20%を超える、50%を超える、またはそれ以上、通常は最大約90%~100%）を構成するような、物質の単離を指す。ある特定の実施形態では、実質的に精製された成分は、試料の少なくとも50%、80%~85%、また90%~95%を含む。目的のポリヌクレオチド及びポリペプチドを精製するための技術は当該技術分野で周知であり、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、及び密度に応じた沈降が含まれる。一般に、物質は、試料の他の成分と比較して、自然に見られる量よりも多い量で試料に存在する場合に精製される。

40

【0083】

本明細書で使用する場合、「二重鎖」、「二本鎖」または「ハイブリダイズ」という用語は、相補的配列を含有する核酸の2本の一本鎖のハイブリダイゼーションによって形成

50

された核酸を指す。ほとんどの場合、ゲノムDNAは二本鎖である。配列は、完全に相補的または部分的に相補的であることができる。

【0084】

本明細書で使用する場合、RNAに関して「非構造化」とは、RNAFoldソフトウェアまたは同様の予測ツールによって、それ自体または同じRNA分子内の他の配列と構造（例えば、ヘアピンループ）を形成すると予測されないRNA配列を指す。一部の実施形態では、非構造化RNAは、ヌクレアーゼ保護アッセイを使用して機能的に特徴評価することができる。

【0085】

本明細書で使用する場合、RNAに関して「構造化」とは、RNAFoldソフトウェアまたは同様の予測ツールによって、それ自体または同じRNA分子内の他の配列と構造（例えば、ヘアピンループ）を形成すると予測されるRNA配列を指す。

10

【0086】

本明細書で使用する場合、2つの「二重鎖形成領域」、「相同アーム」、または「相同領域」は、2つの領域が、ハイブリダイゼーション反応のための基質として作用するのに十分なレベルの配列同一性を互いの逆相補体と共有する場合、互いに、補完する、または相補的である。本明細書で使用する場合、ポリヌクレオチド配列は、それらが逆相補体または「相補的」配列に対して同一であるまたは配列同一性を共有する場合、「相同性」を有する。相同領域及び対応する相同領域の逆相補体間のパーセント配列同一性は、ハイブリダイゼーションが起こることを可能にする任意のパーセントの配列同一性であり得る。一部の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドの内部二重鎖形成領域は、別の内部二重鎖形成領域と二重鎖を形成することができ、外部二重鎖形成領域と二重鎖を形成しない。

20

【0087】

線状核酸分子は、核酸ホスホジエステル連結が置換基モノヌクレオチドの糖部分の5'炭素及び3'炭素で発生するため、「5'末端」（5'端）及び「3'末端」（3'端）を有すると言われている。新しい連結が5'炭素にあるポリヌクレオチドの端ヌクレオチドは、その5'末端ヌクレオチドである。新しい連結が3'炭素にあるポリヌクレオチドの端ヌクレオチドは、その3'末端ヌクレオチドである。本明細書で使用する場合、末端ヌクレオチドは、3'または5'末端の端位置にあるヌクレオチドである。

【0088】

「転写」は、DNA分子をテンプレートとして使用するRNAポリメラーゼによるRNA分子の形成または合成を意味する。本発明は、転写に使用されるRNAポリメラーゼに関して制限されない。例えば、一部の実施形態では、T7型RNAポリメラーゼを使用することができる。

30

【0089】

「翻訳」は、RNAテンプレートに基づくリボソームによるポリペプチド分子の形成を意味する。

【0090】

本明細書において使用される用語は、単に特定の実施形態を説明することを目的とし、制限することを意図しないことを理解されたい。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、内容が明確に別様に指示しない限り、複数の指示対象を含む。ゆえに、例えば、「細胞」への言及は、2つ以上の細胞の組み合わせ、または細胞の培養物全体を含む；「ポリヌクレオチド」への言及は、実際問題として、そのポリヌクレオチドの多くのコピーを含む。具体的に述べられるまたは文脈から明らかでない限り、本明細書で使用する場合、「または」という用語は、包括的であると理解される。本明細書及び下の残りの本明細書において定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術的及び科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。

40

【0091】

具体的に述べられるまたは文脈から明らかでない限り、本明細書で使用する場合、「約

50

」という用語は、当該技術分野における通常の許容範囲内、例えば、平均の2標準偏差内にあるものと理解される。「約」は、記載される値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、または0.01%内であると理解され得る。文脈から別様に明確でない限り、本明細書に提供する全ての数値は、「約」という用語によって修飾される。

【0092】

本明細書で使用する場合、「コードする」という用語は、ポリマー巨大分子の情報を使用して、第1の分子とは異なる第2の分子の生成を指示する任意のプロセスを広く指す。第2の分子は、第1の分子の化学的性質とは異なる化学構造を有し得る。

10

【0093】

「共投与」とは、本明細書に提供する治療剤を、1つまたは複数の追加の治療剤と併せて、本明細書に提供する治療剤が1つまたは複数の追加の治療剤の効果を向上することができるように、またはその逆であるように、十分に近い時間で投与することを意味する。

【0094】

本明細書で使用する場合、「処置する」及び「予防する」という用語、ならびにそれらに由来する単語は、必ずしも100%または完全な処置または予防を意味するものではない。むしろ、当業者が潜在的な利益または治療効果を有すると認識する処置または予防の程度はさまざまである。本明細書に開示する方法によって提供される処置または予防は、疾患の1つまたは複数の状態または症状の処置または予防を含むことができる。また、本明細書の目的のために、「予防」は、疾患、またはその症状もしくは状態の発症を遅らせることを包含することができる。

20

【0095】

本明細書で使用する場合、「発現配列」という用語は、産物、例えば、ペプチドもしくはポリペプチド、制御核酸、または非コード核酸をコードする核酸配列を指すことができる。ペプチドまたはポリペプチドをコードする例示的な発現配列は、複数のヌクレオチドトライアドを含むことができ、そのそれぞれは、アミノ酸をコードすることができ、「コドン」と称される。

【0096】

本明細書で使用する場合、「スパーサー」は、ポリヌクレオチド配列に沿って2つの他のエレメントを分離する1ヌクレオチドから数百または数千ヌクレオチドの範囲のポリヌクレオチド配列の領域を指す。配列は定義することができるまたは無作為であることもできる。スパーサーは典型的には、非コードである。一部の実施形態では、スパーサーは、二重鎖形成領域を含む。

30

【0097】

本明細書で使用する場合、「スプライス部位」は、スプライシング反応物中にホスホジエステル結合の切断が生じる1つまたは複数のジヌクレオチドを指す。「5'スプライス部位」は、イントロン、例えば、グループIイントロンの天然5'ジヌクレオチドを指す一方で、「3'スプライス部位」は、イントロンの天然3'ジヌクレオチドを指す。

40

【0098】

本明細書で使用する場合、「内部リボソーム侵入部位」または「IRES」は、典型的なRNAキャップ構造の非存在下でポリペプチドの翻訳を開始することができる、10nt~1000nt以上のサイズ範囲のRNA配列または構造エレメントを指す。IRESは典型的には、約500nt~約700ntの長さである。

【0099】

本明細書で使用する場合、「miRNA部位」は、少なくとも8ヌクレオチドの天然miRNA配列と二重鎖を形成することができるポリヌクレオチド内のヌクレオチドのストレッチを指す。

【0100】

50

本明細書で使用する場合、「エンドヌクレアーゼ部位」は、エンドヌクレアーゼタンパク質によって認識及び切断されることができるポリヌクレオチド内のヌクレオチドのストレッチを指す。

【0101】

本明細書で使用する場合、「ビシストロン性RNA」は、2つの異なるタンパク質をコードする2つの発現配列を含むポリヌクレオチドを指す。これらの発現配列は、2A部位またはIRES配列などの切断可能なペプチドによって分離されている場合が多い。

【0102】

本明細書で使用する場合、「共製剤」という用語は、2つ以上の核酸または核酸及び他の活性薬物を含むナノ粒子製剤を指す。典型的には、比率は等モルである、または2つ以上の核酸もしくは核酸及び他の活性薬物の比率計測量で定義される。

10

【0103】

本明細書で使用する場合、「輸送ビヒクル」は、核酸を含む生物学的に活性な作用物質の投与に関連して使用することを一般に意図する標準的な医薬担体、希釈剤、賦形剤などのいずれかを含む。

【0104】

本明細書で使用する場合、「脂質ナノ粒子」という語句は、1つまたは複数の脂質（例えば、一部の実施形態では、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、及びPEG修飾脂質）を含む輸送ビヒクルを指す。

【0105】

本明細書で使用する場合、「カチオン性脂質」という語句は、生理学的pHなどの選択されたpHで正味正電荷を持つ多くの脂質種のいずれかを指す。

20

【0106】

本明細書で使用する場合、「非カチオン性脂質」という語句は、任意の中性、双性イオン性、またはアニオン性脂質を指す。

【0107】

本明細書で使用する場合、「アニオン性脂質」という語句は、生理学的pHなどの選択されたpHで正味負電荷を持つ多くの脂質種のいずれかを指す。

【0108】

本明細書で使用する場合、「イオン化可能脂質」という語句は、生理学的pH4などの選択されたpHで正味正電荷を持ち、生理学的pH7などの他のpHで中性電荷を持つ多くの脂質種のいずれかを指す。

30

【0109】

一部の実施形態では、本明細書に開示する脂質、例えば、イオン化可能脂質は、1つまたは複数の切断可能基を含む。「切断」及び「切断可能」という用語は、本明細書で使用する場合、対象の官能基内またはそれに隣接する原子間の1つまたは複数の化学結合（例えば、共有結合、水素結合、ファンデルワールス力及び／またはイオン相互作用のうちの1つまたは複数）が、壊れる（例えば、加水分解される）、または選択された条件への曝露時に（例えば、酵素条件への曝露時に）壊れることが可能であることを意味する。ある特定の実施形態では、切断可能基は、ジスルフィド官能基であり、特定の実施形態は、選択された生物学的条件（例えば、細胞内条件）への曝露時に切断されることができジスルフィド基である。ある特定の実施形態では、切断可能基は、選択された生物学的条件への曝露時に切断されることができエステル官能基である。例えば、ジスルフィド基は、酵素的に、または加水分解、酸化もしくは還元反応によって切断され得る。かかるジスルフィド官能基の切断時に、それに結合している1つまたは複数の官能部分または基（例えば、頭部基及び／または尾部基のうちの1つまたは複数）は、遊離し得る。例示的な切断可能基には、ジスルフィド基、エステル基、エーテル基、及びその任意の誘導体（例えば、アルキル及びアリールエステル）が含まれ得るが、これに限定されない。ある特定の実施形態では、切断可能基は、エステル基またはエーテル基ではない。一部の実施形態では、切断可能基は、1つまたは複数の官能部分または基（例えば、少なくとも1つの頭部基

40

50

及び少なくとも1つの尾部基)に結合している(例えば、水素結合、ファンデルワールス力、イオン相互作用及び共有結合のうちの1つまたは複数によって結合している)。ある特定の実施形態では、官能部分または基の少なくとも1つは、親水性である(例えば、イミダゾール、グアニジニウム、アミノ、イミン、エナミン、任意選択で置換されたアルキルアミノ及びピリジルのうちの1つまたは複数を含む親水性頭部基)。

【0110】

本明細書で使用する場合、「親水性」という用語は、官能基が水を好み、典型的にはかかる基が水溶性であることを定性的に示すために使用される。例えば、1つまたは複数の親水性基(例えば、親水性頭部基)に結合した切断可能なジスルフィド(S-S)官能基を含む化合物を本明細書に開示し、かかる親水性基は、イミダゾール、グアニジニウム、アミノ、イミン、エナミン、任意選択で置換されたアルキルアミノ(例えば、ジメチルアミノなどのアルキルアミノ)及びピリジルからなる群を含む、またはこれから選択される。

10

【0111】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示する化合物を含む部分の官能基の少なくとも1つは、本質的に疎水性である(例えば、コレステロールなどの天然に存在する脂質を含む疎水性尾部基)。本明細書で使用する場合、「疎水性」という用語は、官能基が水を嫌い、典型的にはかかる基が水溶性でないことを定性的に示すために使用される。例えば、1つまたは複数の疎水性基に結合した切断可能な官能基(例えば、ジスルフィド(S-S)基)を含む化合物を本明細書に開示し、かかる疎水性基は、1つもしくは複数の天然に存在する脂質、例えばコレステロール、及び/または任意選択で置換された、可変飽和もしくは不飽和C₆-C₂₀アルキル及び/または任意選択で置換された、可変飽和もしくは不飽和C₆-C₂₀アシルを含む。

20

【0112】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示する化合物は、例えば、少なくとも1つの親水性頭部基及び少なくとも1つの疎水性尾部基を含み、それぞれが少なくとも1つの切断可能基に結合し、それによってかかる化合物を両親媒性にする。化合物または組成物を説明するために本明細書で使用する場合、「両親媒性」という用語は、極性(例えば、水)及び非極性(例えば、脂質)環境の両方に溶解する能力を意味する。例えば、ある特定の実施形態では、本明細書に開示する化合物は、少なくとも1つの親油性尾部基(例えば、コレステロールまたはC₆-C₂₀アルキル)及び少なくとも1つの親水性頭部基(例えば、イミダゾール)を含み、それぞれ切断可能基(例えば、ジスルフィド)に結合している。

30

【0113】

使用される「頭部基」及び「尾部基」という用語は、本発明の化合物、及び特にかかる化合物を含む官能基を説明し、他の官能基に対する1つまたは複数の官能基の配向を説明するために参照を容易にするために使用されることに留意されるべきである。例えば、ある特定の実施形態では、親水性頭部基(例えば、グアニジニウム)は、(例えば、水素結合、ファンデルワールス力、イオン相互作用及び共有結合のうちの1つまたは複数によって)切断可能な官能基(例えば、ジスルフィド基)に結合し、これは次に親水性尾部基(例えば、コレステロール)に結合する。

【0114】

本明細書で使用する場合、「アルキル」という用語は、直鎖及び分枝鎖C₁-C₄₀炭化水素(例えば、C₆-C₂₀炭化水素)の両方を指し、飽和及び不飽和炭化水素の両方を含む。ある特定の実施形態では、アルキルは、1つもしくは複数の環状アルキル及び/または1つもしくは複数のヘテロ原子、例えば酸素、窒素、もしくは硫黄を含んでよく、任意選択で置換基(例えば、アルキル、ハロ、アルコキシ、ヒドロキシ、アミノ、アリール、エーテル、エステルまたはアミドのうちの1つまたは複数)で置換されてよい。ある特定の実施形態では、企図されるアルキルは、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエンを含む。例えば、「C₆-C₂₀」などの呼称の使用は、記載された範囲の炭素原子を有するアルキル(例えば、直鎖または分枝鎖であり、アルケン及びアルキルを含む)を指すことを意図する。

40

50

【0115】

本明細書で使用する場合、「アリール」という用語は、環部分に6～10個の炭素を含有する芳香族基（例えば、単環式、二環式及び三環式構造）を指す。アリール基は、利用可能な炭素原子を通して任意選択で置換されてよく、ある特定の実施形態では、1つまたは複数のヘテロ原子、例えば酸素、窒素または硫黄を含んでよい。

【0116】

ある特定の実施形態では、化合物及びかかる化合物が成分である輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）は、1つまたは複数の標的細胞をトランスフェクトする能力の向上（例えば、増加）を呈する。したがって、1つまたは複数の標的細胞をトランスフェクトする方法も本明細書に提供する。かかる方法は、一般に、1つまたは複数の標的細胞がその中に封入された環状RNAでトランスフェクトされるように、1つまたは複数の標的細胞を、本明細書に開示する化合物及び／または医薬組成物と接触させるステップを含む。本明細書で使用する場合、「トランスフェクトする」または「トランスフェクション」という用語は、1つまたは複数の封入された物質（例えば、核酸及び／またはポリヌクレオチド）の、細胞への、または好ましくは標的細胞への細胞内導入を指す。「トランスフェクション効率」という用語は、トランスフェクションの対象となる標的細胞によって取り込まれる、標的細胞へと導入される及び／または標的細胞によって発現されるかかる封入された物質（例えば、ポリヌクレオチド）の相対量を指す。一部の実施形態では、トランスフェクション効率は、トランスフェクション後に標的細胞によって産生されるレポーターポリヌクレオチド産物の量によって推定され得る。一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、高いトランスフェクション効率を有する。一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%のトランスフェクション効率を有する。

【0117】

本明細書で使用する場合、「リポソーム」という用語は、一般に、1つまたは複数の球状二重層に配置された脂質（例えば、両親媒性脂質）から構成されるベシクルを指す。ある特定の実施形態では、リポソームは、脂質ナノ粒子（例えば、本明細書に開示するイオン化可能脂質化合物のうちの1つまたは複数を含む脂質ナノ粒子）である。かかるリポソームは、親油性物質から形成された膜、ならびに1つまたは複数の標的細胞、組織、及び器官に送達される封入されたcircRNAを含有する水性内部を有する単層または多層ベシクルであり得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、1つまたは複数の脂質ナノ粒子を含む。企図されるリポソーム及び脂質ナノ粒子を形成するために使用され得る好適な脂質（例えば、イオン化可能脂質）の例としては、本明細書に開示する化合物のうちの1つまたは複数が挙げられる（例えば、HGT4001、HGT4002、HGT4003、HGT4004及び／またはHGT4005）。かかるリポソーム及び脂質ナノ粒子は、追加のイオン化可能脂質、例えばC12-200、DLin-KC2-DMA、及び／またはHGT5001、ヘルパー脂質、構造脂質、PEG修飾脂質、MC3、DLinDMA、DLinKC2DMA、cKK-E12、ICE、HGT5000、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA、DMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、HGT4003、及びそれらの組み合わせも含み得る。

【0118】

本明細書で使用する場合、「非カチオン性脂質」、「非カチオン性ヘルパー脂質」、及び「ヘルパー脂質」という語句は、互換可能に使用され、任意の中性、双性イオン性またはアニオン性脂質を指す。

【0119】

本明細書で使用する場合、「アニオン性脂質」という語句は、生理学的pHなどの選択されたpHで正味負電荷を持つ多くの脂質種のいずれかを指す。

【0120】

本明細書で使用する場合、「生分解性脂質」または「分解性脂質」という語句は、宿主環境で数分、数時間、または数日ほどで分解され、理想的には毒性が低くなる及び宿主内に経時的に蓄積する可能性が低くなる、多くの脂質種のいずれかを指す。脂質への一般的な修飾には、エステル結合、及びなかでもジスルフィド結合を含み、脂質の生分解性を高める。

【0121】

本明細書で使用する場合、「生分解性PEG脂質」または「分解性PEG脂質」という語句は、PEG分子が、宿主環境で数分、数時間、または数日ほどで脂質から切断され、理想的には免疫原性が低くなる、多くの脂質種のいずれかを指す。PEG脂質への一般的な修飾には、エステル結合、及びなかでもジスルフィド結合を含み、脂質の生分解性を高める。

10

【0122】

本発明のある特定の実施形態では、輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）は、1つまたは複数の物質または治療剤（例えば、circRNA）を封入するように調製される。所望の治療剤（例えば、circRNA）を輸送ビヒクルに組み込むプロセスは、本明細書では、「ロードする」または「封入する」と称する（Lasic, et al., FEB S Lett., 312:255-258, 1992）。輸送ビヒクルにロードされた、または封入された物質（例えば、circRNA）は、完全にまたは部分的に、輸送ビヒクルの内部空間に、輸送ビヒクルの二重層膜内に、または輸送ビヒクルの外面に付随して配置され得る。

20

【0123】

本明細書で使用する場合、「構造脂質」という用語は、ステロールを指す、及びステロール部分を含有する脂質も指す。

【0124】

本明細書で定義する場合、「ステロール」は、ステロイドアルコールからなるステロイドのサブグループである。

【0125】

本明細書で使用する場合、「構造脂質」という用語は、ステロールを指す、及びステロール部分を含有する脂質も指す。

30

【0126】

本明細書で使用する場合、「PEG」という用語は、任意のポリエチレングリコールまたは他のポリアルキレンエーテルポリマーを意味する。

【0127】

本明細書で一般に定義する場合、「PEG-OH脂質」（本明細書では「ヒドロキシーPEG化脂質」とも称する）は、脂質上に1つまたは複数のヒドロキシル（-OH）基を有するPEG化脂質である。

【0128】

本明細書で使用する場合、「リン脂質」は、リン酸部分及び1つまたは複数の炭素鎖、例えば不飽和脂肪酸鎖を含む脂質である。

40

【0129】

「抗体」（Ab）という用語は、限定されないが、抗原に特異的に結合する糖タンパク質免疫グロブリンを含む。一般的に、抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続される少なくとも2本の重（H）鎖及び2本の軽（L）鎖、またはその抗原結合分子を含み得る。各H鎖は、重鎖可変領域（本明細書でVHと略記する）及び重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3つの定常ドメイン、CH1、CH2、及びCH3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書でVLと略記する）及び軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1つの定常ドメイン、CLを含む。VH及びVL領域は、フレームワーク領域（FR）と称されるより保存された領域と散在する、相補性特定領域（CDR）と称される超可変性の領域に、さらに細分され得る。各VH及びVLは、3つのCDR及び4つのFRを含み、ア

50

ミノ末端からカルボキシ末端へと、次の順序で配列される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系のさまざまな細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的補体系の第1成分を含む、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。抗体には、例えば、モノクローナル抗体、組換え産生抗体、単一特異性抗体、多重特異性抗体（二重特異性抗体を含む）、ヒト抗体、操作抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、免疫グロブリン、合成抗体、2本の重鎖分子及び2本の軽鎖分子を含む四量体抗体、抗体軽鎖モノマー、抗体重鎖モノマー、抗体軽鎖ダイマー、抗体重鎖ダイマー、抗体軽鎖-抗体重鎖対、イントラボディ、抗体融合物（本明細書では、「抗体コンジュゲート」と称する場合がある）、ヘテロコンジュゲート抗体、単一ドメイン抗体、一価抗体、一本鎖抗体または一本鎖Fv（scFv）、ラクダ化抗体、アフィボディ、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、ジスルフィド連結Fv（sdFv）、抗イディオタイプ（anti-id）抗体（例えば、抗anti-id抗体を含む）、ミニボディ、ドメイン抗体、合成抗体（本明細書では「抗体ミメティック」と称する場合がある）、ならびに上記のいずれかの抗原結合フラグメントが含まれ得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の抗体は、ポリクローナル抗体集団を指す。

【0130】

免疫グロブリンは、IgA、分泌型IgA、IgG及びIgMを含むがこれに限定されない、一般的に知られているアイソタイプのいずれかに由来し得る。IgGサブクラスも当業者に周知であり、ヒトIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4が含まれるが、これに限定されない。「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラスまたはサブクラス（例えば、IgMまたはIgG1）を指す。「抗体」という用語は、例として、天然に存在する抗体及び天然に存在しない抗体の両方；モノクローナル及びポリクローナル抗体；キメラ及びヒト化抗体；ヒトまたは非ヒト抗体；完全合成抗体；及び一本鎖抗体を含む。非ヒト抗体は、ヒトにおけるその免疫原性を低下させるために組換え法によってヒト化され得る。明示的に記載されていない場合、及び文脈が別様に指定しない限り、「抗体」という用語は、前述の免疫グロブリンのいずれかの抗原結合フラグメントまたは抗原結合部分も含み、一価及び二価のフラグメントまたは部分、ならびに一本鎖抗体も含む。

【0131】

「抗原結合分子」、「抗原結合部分」、または「抗体フラグメント」は、分子が由来する抗体の抗原結合部（例えば、CDR）を含む任意の分子を指す。抗原結合分子は、抗原相補性特定領域（CDR）を含み得る。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFvフラグメント、dAb、線状抗体、scFv抗体、及び抗原結合分子から形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これに限定されない。ペプチボディ（すなわち、ペプチド結合ドメインを含むFc融合分子）は、好適な抗原結合分子の別の例である。一部の実施形態では、抗原結合分子は、腫瘍細胞上の抗原に結合する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、過剰増殖性疾患に関与する細胞上の抗原、またはウイルスもしくは細菌抗原に結合する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、BCMAに結合する。さらなる実施形態では、抗原結合分子は、その相補性特定領域（CDR）のうちの1つまたは複数を含む、抗原に特異的に結合する抗体フラグメントである。さらなる実施形態では、抗原結合分子は、一本鎖可変フラグメント（scFv）である。一部の実施形態では、抗原結合分子は、アビマーを含むまたはそれからなる。

【0132】

本明細書で使用する場合、「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、互換可能に使用され、当該技術分野で一般的である。可変領域は、典型的には、抗体の一部、一般に、軽鎖または重鎖の一部、典型的には、成熟重鎖のアミノ末端約110～120アミノ酸及び成熟軽鎖の約90～115アミノ酸を指し、これは抗体間で配列が大きく異なり、特定の抗原に対する特定の抗体の結合及び特異性に使用される。配列の変動性は、相補性特定領域（CDR）と呼ばれる領域に集中し、可変ドメイン内のより高度に保存された

領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる。いずれの特定のメカニズムまたは理論にも拘束されることを望まないが、軽鎖及び重鎖のCDRは、抗体と抗原との相互作用及び特異性に主に関与していると考えられている。一部の実施形態では、可変領域は、ヒト可変領域である。一部の実施形態では、可変領域は、げっ歯類またはマウスCDR及びヒトフレームワーク領域（FR）を含む。特定の実施形態では、可変領域は、霊長類（例えば、非ヒト霊長類）可変領域である。一部の実施形態では、可変領域は、げっ歯類またはマウスCDR及び霊長類（例えば、非ヒト霊長類）フレームワーク領域（FR）を含む。

【0133】

「VL」及び「VLドメイン」という用語は、互換可能に使用され、抗体またはその抗原結合分子の軽鎖可変領域を指す。

【0134】

「VH」及び「VHドメイン」という用語は、互換可能に使用され、抗体またはその抗原結合分子の重鎖可変領域を指す。

【0135】

CDRの多くの定義が一般的に使用される：Kabat番号付け、Chothia番号付け、AbM番号付け、または接触番号付け。AbM定義は、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって使用される、この2つの間の折衷案である。接触定義は、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。「Kabat番号付け」という用語及び同様の用語は、当該技術分野で認識されており、抗体またはその抗原結合分子の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸残基に番号付けするシステムを指す。ある特定の態様では、抗体のCDRは、Kabat番号付けシステムに従って決定され得る（例えば、Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190:382-391及びKabat EA et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい）。Kabat番号付けシステムを使用する場合、抗体重鎖分子内のCDRは、典型的には、アミノ酸位置31～35、これは35に続く1つまたは2つの追加のアミノ酸（Kabat番号付けスキームでは35A及び35Bと称する）を任意選択で含み得る（CDR1）、アミノ酸位置50～65（CDR2）、及びアミノ酸位置95～102（CDR3）に存在する。Kabat番号付けシステムを使用する場合、抗体軽鎖分子内のCDRは、典型的には、アミノ酸位置24～34（CDR1）、アミノ酸位置50～56（CDR2）、及びアミノ酸位置89～97（CDR3）に存在する。特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体のCDRは、Kabat番号付けスキームに従って決定されている。ある特定の態様では、抗体のCDRは、Chothia番号付けスキームに従って決定され得、これは免疫グロブリン構造ループの位置を参照する（例えば、Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196:901-917; Al-Lazikani B et al, (1997) J Mol Biol 273:927-948; Chothia C et al., (1992) J Mol Biol 227:799-817; Tramontano A et al, (1990) J Mol Biol 215(1):175-82; 及び米国特許第7,709,226号を参照されたい）。典型的には、Kabat番号付け規則を使用する場合、Chothia CDR-H1ループは、重鎖アミノ酸26～32、33、または34に存在し、Chothia CDR-H2ループは、重鎖アミノ酸52～56に存在し、Chothia CDR-H3ループは、重鎖アミノ酸95～102に存在する一方で、Chothia CDR-L1ループは、軽鎖アミノ酸24～34に存在し、Chothia CDR-L2ループは、軽鎖アミノ酸50～56に存在し、Chothia CDR-L3ループは、軽鎖アミノ酸89～97に存在する。Kabat番号付け規則を用いて番号付けした場合、Chothia CDR-H1ループの末端は、ループの長さに応じてH32及びH34間で変動する（これは、Kabat番号付けスキームがH35A及

10

20

30

40

50

びH35Bに挿入を配置するためである；35Aも35Bも存在しない場合、このループは32で終わる；35Aのみが存在する場合、このループは33で終わる；35A及び35Bの両方が存在する場合、このループは34で終わる）。特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体のCDRは、Chothia番号付けスキームに従って決定されている。

【0136】

本明細書で使用する場合、「定常領域」及び「定常ドメイン」という用語は、互換可能であり、当該技術分野で一般的な意味を有する。定常領域は、抗体部分、例えば、軽鎖及び／または重鎖のカルボキシル末端部分であり、抗体の抗原への結合に直接関与しないが、Fc受容体との相互作用などのさまざまなエフェクター機能を呈し得る。免疫グロブリン分子の定常領域は、一般に、免疫グロブリン可変ドメインと比べて、より保存されたアミノ酸配列を有する。

【0137】

「結合親和性」は、一般に、分子（例えば、抗体）の単一結合部位及びその結合パートナー（例えば、抗原）間の非共有結合的相互作用の合計の強度を指す。別様に指定されない限り、本明細書で使用する場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体及び抗原）間の1：1相互作用を反映する、本来の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数（KDまたはKd）によって表され得る。親和性は、平衡解離定数（KD）、及び平衡会合定数（KAまたはKa）を含むがこれに限定されない、当該技術分野で公知の多くの方法で測定され得る及び／または表現され得る。KDは、 k_{off}/k_{on} の商から計算されるのに対し、KAは、 k_{on}/k_{off} の商から計算される。konは、例えば、抗原に対する抗体の会合速度定数を指し、koffは、例えば、抗原に対する抗体の解離を指す。kon及びkoffは、BIAcore（登録商標）またはKinExAなどの当業者に公知の技術によって決定され得る。

【0138】

本明細書で使用する場合、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられる置換である。側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合分子のCDR（複数可）内またはフレームワーク領域（複数可）内の1つまたは複数のアミノ酸残基は、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられ得る。

【0139】

本明細書で使用する場合、「異種」という用語は、天然に存在する配列以外の任意の供給源に由来することを意味する。

【0140】

本明細書で使用する場合、「エピトープ」は、当該技術分野の用語であり、抗体が特異的に結合し得る抗原の局在的な領域を指す。エピトープは、例えば、ポリペプチドの連続アミノ酸（線状または連続エピトープ）であり得る、またはエピトープは、例えば、1つもしくは複数のポリペプチドの2つ以上の非連続領域（立体配座、非線状、断続、または非連続エピトープ）から一緒になることができる。一部の実施形態では、抗体が結合するエピトープは、例えば、NMR分光法、X線回折結晶学研究、ELISAアッセイ、水素／重水素交換と質量分析（例えば、液体クロマトグラフィーエレクトロスプレー質量分析）、アレイベースのオリゴペプチドスクニングアッセイ、及び／または突然変異誘発マッピング（例えば、部位特異的突然変異誘発マッピング）によって決定され得る。X線結晶学の場合、結晶化は、当該技術分野で公知の方法（例えば、Giege Ret al

10

20

30

40

50

., (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50 (Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303) のいずれかを使用して達成され得る。抗体：抗原結晶は、周知のX線回折技術を使用して研究し得、コンピュータソフトウェア、例えばX-PLOR (Yale University, 1992, Molecular Simulations, Inc. により配布；例えば、*Meth Enzymol* (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW et al.; U.S. 2004/0014194を参照されたい)、及びBUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49 (Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P et al., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 10): 1316-1323) を使用して精査し得る。

[0141]

本明細書で使用する場合、抗原結合分子、抗体、またはその抗原結合分子は、抗原及び第1の結合分子、抗体、またはその抗原結合分子間の相互作用が、参照結合分子、参照抗体、またはその抗原結合分子が抗原と相互作用する能力を遮断、制限、阻害、またはそうでなければ低下させる場合に、参照抗体またはその抗原結合分子と「交差競合する」。交差競合は、完全であり得る、例えば、結合分子の抗原への結合は、参照結合分子が抗原に結合する能力を完全に遮断する、または部分的であり得る、例えば、結合分子の抗原への結合は、参照結合分子が抗原に結合する能力を低下させる。一部の実施形態では、参照抗原結合分子と交差競合する抗原結合分子は、参照抗原結合分子と同じまたは重複するエピトープと結合する。他の実施形態では、参照抗原結合分子と交差競合する抗原結合分子は、参照抗原結合分子と異なるエピトープと結合する。多数のタイプの競合結合アッセイを使用して、ある抗原結合分子が別の抗原結合分子と競合するか否かを決定し得る、例えば、固相直接または間接ラジオイムノアッセイ (RIA)；固相直接または間接酵素免疫測定法 (EIA)；サンドイッチ競合アッセイ (Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9: 242-253)；固相直接ビオチン-アビジンEIA (Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137: 3614-3619)；固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ (Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press)；1-125ラベルを使用した固相直接ラベルRIA (Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25: 7-15)；固相直接ビオチン-アビジンEIA (Cheung, et al., 1990, *Virology* 176: 546-552)；及び直接標識RIA (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32: 77-82)。

[0142]

本明細書で使用する場合、「免疫特異的に結合する」、「免疫特異的に認識する」、「特異的に結合する」、及び「特異的に認識する」という用語は、抗体の文脈において類似の用語であり、抗原（例えば、エピトープまたは免疫複合体）に結合する分子を指し、かかる結合は、当業者によって理解されている。例えば、抗原に特異的に結合する分子は、他のペプチドまたはポリペプチドに、例えば、イムノアッセイ、BIACORE（登録商標）、KinExA 3000機器 (Sapidyne Instruments, Boise, ID)、または当該技術分野で公知の他のアッセイによって決定されて、一般により低い親和性で結合し得る。特定の実施形態では、抗原に特異的に結合する分子は、抗原に、分子が別の抗原に結合する場合のKAよりも少なくとも2ログ、2.5ログ、3ログ、4ログ、またはそれより大きいKAで結合する。

【0143】

「抗原」は、免疫応答を誘発する、または抗体もしくは抗原結合分子によって結合されることができる任意の分子を指す。免疫応答には、抗体産生、もしくは特定の免疫学的コンピテント細胞の活性化、またはその両方が含まれ得る。当業者は、事実上全てのタンパク質またはペプチドを含む任意の巨大分子が、抗原として機能し得ることを容易に理解するだろう。抗原は、内因的に発現され得る、すなわち、ゲノムDNAによって発現され得る、または組換え的に発現され得る。抗原はがん細胞などのある特定の組織に特異的であり得る、または抗原は広く発現し得る。加えて、より大きな分子のフラグメントが抗原として作用し得る。一部の実施形態では、抗原は、腫瘍抗原である。

【0144】

「自己」という用語は、任意の物質が後に再導入される同じ個体に由来する任意の物質を指す。例えば、本明細書に記載の操作された自己細胞療法（eACT（商標））の方法は、患者からリンパ球を収集し、次にこれを、例えば、CARコンストラクトを発現するように操作し、次に、同じ患者に投与し戻す事を含む。

【0145】

「同種異系」という用語は、ある個体に由来し、次に同じ種の別の個体に導入される任意の物質を指す、例えば、同種異系T細胞移植。

【0146】

「がん」は、体内での異常細胞の制御不能な成長を特徴とするさまざまな疾患の幅広い群を指す。制御不能な細胞分裂及び成長は、近隣の組織に侵入する悪性腫瘍の形成をもたらす、さらにリンパ系または血流を通して体の離れた部分にも転移し得る。「がん」または「がん組織」は、腫瘍を含み得る。本明細書に開示する方法によって処置され得るがんの例としては、リンパ腫、白血病、骨髄腫、及び他の白血球悪性腫瘍を含む免疫系のがんが挙げられるが、これに限定されない。一部の実施形態では、本明細書に開示する方法を使用して、例えば、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部のがん、皮膚または眼内悪性黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門領域のがん、胃癌、精巣癌、子宮癌、多発性骨髄腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（NHL）、原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫（PMBC）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫（FL）、形質転換濾胞性リンパ腫、脾臓辺縁帯リンパ腫（SMZL）、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、副腎のがん、尿道のがん、陰茎のがん、慢性または急性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）（非T細胞ALLを含む）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、小児固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱のがん、腎臓または尿管のがん、中枢神経系（CNS）新生物、原発性CNSリンパ腫、腫瘍血管新生、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、類表皮癌、扁平上皮癌、T細胞リンパ腫、アスベストによって誘発されるものを含む環境誘発癌、他のB細胞悪性腫瘍、及び前記がんの組み合わせに由来する腫瘍の腫瘍サイズを低下し得る。一部の実施形態では、本明細書に開示する方法を使用して、例えば、肉腫及び癌腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨形成性肉腫、カポジ肉腫、軟部組織の肉腫、及び他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、肺癌、結腸直腸癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌（例えば、膵臓、結腸、卵巣、肺、乳房、胃、前立腺、子宮頸部、または食道の腺癌）、汗腺癌、脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、髄質癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝細胞腫、胆管癌、脈絡癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、膀胱癌、ファロピウス管の癌腫、子宮内膜の癌腫、子宮頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰部の癌腫、腎骨盤の癌腫、CNS腫瘍（例えば、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫瘍、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫（meningioma）、黒色腫、神経芽細胞腫及び網膜芽細胞腫）に由来する腫瘍の腫瘍サイズを低下し得る。特定のがんは、化学療法または放射線療法に反応し得る、またはがんは難治性であり得る。難治性がん（refractor cancer）は、外科的介入が適さないがんを指し、がんは、最初から化学療法もしくは放射線療法に反応しない、または時間の経過とともに反応しなく

10

20

30

40

50

なる。

【0147】

本明細書で使用する場合、「抗腫瘍効果」は、腫瘍体積の低減、腫瘍細胞の数の低減、腫瘍細胞増殖の低減、転移の数の低減、全体的もしくは無増悪生存の増加、平均余命の増加、または腫瘍に関連するさまざまな身体的症状の改善として提示され得る生物学的効果を指す。抗腫瘍効果は、腫瘍の発生の予防、例えばワクチンも指し得る。

【0148】

本明細書で使用する場合、「サイトカイン」は、特定の抗原との接触に応答してある細胞によって放出される非抗体タンパク質を指し、サイトカインは、第2の細胞と相互作用して、第2の細胞における応答を媒介する。本明細書で使用する場合、「サイトカイン」は、別の細胞上で細胞間媒介物として作用する、ある細胞集団によって放出されるタンパク質を指すと意図される。サイトカインは、細胞によって内因的に発現される、または対象に投与され得る。サイトカインは、マクロファージ、樹状細胞、B細胞、T細胞、及びマスト細胞を含む免疫細胞によって放出されて、免疫応答を伝播し得る。サイトカインは、レシピエント細胞においてさまざまな応答を誘発し得る。サイトカインには、恒常性サイトカイン、ケモカイン、炎症促進性サイトカイン、エフェクター、及び急性期タンパク質が含まれ得る。例えば、インターロイキン(IL)7及びIL-15を含む恒常性サイトカインは、免疫細胞生存及び増殖を促進し、炎症促進性サイトカインは、炎症応答を促進し得る。恒常性サイトカインの例としては、IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-15、及びインターフェロン(IFN)ガンマが挙げられるが、これに限定されない。炎症促進性サイトカインの例としては、IL-1a、IL-1b、IL-6、IL-13、IL-17a、IL-23、IL-27、腫瘍壊死因子(TNF)-アルファ、TNF-ベータ、線維芽細胞成長因子(FGF)2、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、可溶性細胞間接着分子1(sICAM-1)、可溶性血管接着分子1(sVCAM-1)、血管内皮成長因子(VEGF)、VEGF-C、VEGF-D、及び胎盤成長因子(PLGF)が挙げられるが、これに限定されない。エフェクターの例としては、グランザイムA、グランザイムB、可溶性Fasリガンド(sFasL)、TGF-ベータ、IL-35、及びパーフォリンが挙げられるが、これに限定されない。急性期タンパク質の例としては、C反応性タンパク質(CRP)及び血清アミロイドA(SAA)が挙げられるが、これに限定されない。

【0149】

本明細書で使用する場合、「リンパ球」という用語は、ナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞、またはB細胞を含む。NK細胞は、細胞傷害性(細胞毒性)リンパ球の一種であり、生来の免疫系の主要な構成要素を代表する。NK細胞は、ウイルスに感染した腫瘍及び細胞を拒絶する。それは、アポトーシスまたはプログラム細胞死のプロセスを通して機能する。それらは細胞を殺すために活性化を必要としないので「ナチュラルキラー」と名付けられた。T細胞は、細胞媒介性免疫において主要な役割を果たす(抗体の関与なし)。そのT細胞受容体(TCR)は、それら自体と他のリンパ球型とを識別する。免疫系の特殊化器官である胸腺は、主にT細胞の成熟を担う。T細胞には6つのタイプがある、いわゆる：ヘルパーT細胞(例えば、CD4+細胞)、細胞傷害性T細胞(TC、細胞傷害性Tリンパ球、CTL、Tキラー細胞、細胞溶解性T細胞、CD8+T細胞またはキラーT細胞としても知られる)、メモリーT細胞((i) ナイーブ細胞のような幹メモリーTSCM細胞は、CD45RO-、CCR7+、CD45RA+、CD62L+(L-セレクトリン)、CD27+、CD28+及びIL-7Ra+であるが、それらは大量のCD95、IL-2R[TCXCR3、及びLFA-1も発現し、メモリー細胞に特有の多数の機能属性を示す；(ii) セントラルメモリーTCM細胞は、L-セレクトリン及びCCR7を発現し、これらはIL-2を分泌するが、IFNyまたはIL-4は分泌しない、ならびに(iii) エフェクターメモリーTEM細胞は、L-セレクトリンまたはCCR7を発現しないが、IFNy及びIL-4のようなエフェクターサイトカインを産生する

10

20

30

40

50

）、制御性T細胞（Treg、サプレッサーT細胞、またはCD4+CD25+もしくはCD4+FoxP3+制御性T細胞）、ナチュラルキラーT細胞（NKT）及びガンマデルタT細胞である。一方、B細胞は、体液性免疫において主な役割を果たす（抗体の関与を伴う）。B細胞は、抗体及び抗原を作製し、抗原提示細胞（APC）の役割を果たし、抗原相互作用によって活性化された後、短命及び長命両方の、メモリーB細胞及び形質細胞になる。哺乳動物では、未熟なB細胞が骨髄で形成され、その名前の由来となっている。

【0150】

「遺伝子操作された」または「操作された」という用語は、コード領域もしくは非コード領域またはその一部を削除すること、あるいはコード領域またはその一部を挿入することを含むがこれに限定されない、細胞のゲノムを修飾する方法を指す。一部の実施形態では、修飾される細胞は、リンパ球、例えば、T細胞であり、これは、患者またはドナーから取得され得る。細胞は、例えば、細胞のゲノムに組み込まれる、キメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR）などの外因性コンストラクトを発現するように修飾され得る。

【0151】

「免疫応答」は、免疫系の細胞（例えば、Tリンパ球、Bリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、樹状細胞及び好中球）、及びこれらの細胞のいずれかまたは肝臓によって産生される可溶性巨大分子（抗体、サイトカイン、及び補体を含む）の作用を指し、その結果、侵入病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、がん性細胞もしくは他の異常細胞、または自己免疫もしくは病的炎症の場合は、正常なヒト細胞もしくは組織が、選択的に標的となる、結合される、損傷を受ける、破壊される、及び／または脊椎動物の体から排除される。

【0152】

本明細書で使用する場合、「共刺激シグナル」は、一次シグナルと組み合わせたシグナルを指し、例えばTCR／CD3ライゲーションは、T細胞応答、例えば限定されないが、鍵となる分子の増殖及び／または上方制御もしくは下方制御をもたらす。

【0153】

本明細書で使用する場合、「共刺激リガンド」は、T細胞上の同族の共刺激分子に特異的に結合する抗原提示細胞上の分子を含む。共刺激リガンドの結合は、増殖、活性化、分化などを含むがこれに限定されない、T細胞応答を媒介するシグナルを提供する。共刺激リガンドは、刺激分子によって、例えば、ペプチドがロードされた主要組織適合複合体（MHC）分子とのT細胞受容体（TCR）／CD3複合体の結合によって提供される一次シグナルに加えて、シグナルを誘導する。共刺激リガンドには、3／TR6、4－1BBリガンド、Tollリガンド受容体と結合するアゴニストもしくは抗体、B7－1（CD80）、B7－2（CD86）、CD30リガンド、CD40、CD7、CD70、CD83、ヘルペスウイルスエントリーメディエーター（HVEM）、ヒト白血球抗原G（HLA-G）、ILT4、免疫グロブリン様転写産物（ILT）3、誘導性共刺激リガンド（ICOS-L）、細胞間接着分子（ICAM）、B7－H3と特異的に結合するリガンド、リンフォトキシンベータ受容体、MHCクラスI鎖関連タンパク質A（MICA）、MHCクラスI鎖関連タンパク質B（MICB）、OX40リガンド、PD-L2、またはプログラム細胞死（PD）L1が含まれ得るが、これに限定されない。共刺激リガンドには、限定されないが、4－1BB、B7－H3、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD7、ICOS、CD83と特異的に結合するリガンド、リンパ球機能関連抗原－1（LFA－1）、ナチュラルキラー細胞受容体C（NKG2C）、OX40、PD－1、または腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー14（TNFSF14またはLIGHT）などのT細胞上に存在する共刺激分子と特異的に結合する抗体が含まれる。

【0154】

「共刺激分子」は、共刺激リガンドと特異的に結合することによって、T細胞による共刺激応答、例えば限定されないが、増殖を媒介する、T細胞上の同族結合パートナーである。共刺激分子は、を含むがこれに限定されない、「共刺激分子」は、共刺激リガンドと

特異的に結合することによって、T細胞による共刺激応答、例えば限定されないが、増殖を媒介する、T細胞上の同族結合パートナーである。共刺激分子には、4-1BB/CD137、B7-H3、BAFFR、BLAME (SLAMF8)、BTLA、CD33、CD45、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD134、CD137、CD154、CD16、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD19a、CD2、CD22、CD247、CD27、CD276 (B7-H3)、CD28、CD29、CD3 (アルファ; ベータ; デルタ; イプシロン; ガンマ; ゼータ)、CD30、CD37、CD4、CD4、CD40、CD49a、CD49D、CD49f、CD5、CD64、CD69、CD7、CD80、CD83リガンド、CD84、CD86、CD8アルファ、CD8ベータ、CD9、CD96 (Tactile)、CD1-1a、CD1-1b、CD1-1c、CD1-1d、CDS、CEACAM1、CRTAM、DAP-10、DNAM1 (CD226)、Fcガンマ受容体、GADS、GITR、HVEM (LIGHT)、IA4、ICAM-1、ICAM-1、ICOS、Igアルファ (CD79a)、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、インテグリン、ITGA4、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB2、ITGB7、ITGB1、KIRDS2、LAT、LFA-1、LFA-1、LIGHT、LIGHT (腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー14; TNFSF14)、LTBR、Ly9 (CD229)、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1 (CD11a/CD18)、MHCクラスI分子、NKG2C、NKG2D、NKP30、NKP44、NKP46、NKP80 (KLRF1)、OX40、PAG/Cbp、PD-1、PSGL1、SELPLG (CD162)、シグナル伝達リンパ球活性化分子、SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3)、SLAMF4 (CD244; 2B4)、SLAMF6 (NTB-A; Ly108)、SLAMF7、SLP-76、TNF、TNFr、TNFR2、トールリガンド受容体、TRANCE/RANKL、VLA1、もしくはVLA-6、またはそのフラグメント、トランケーション、もしくは組み合わせが含まれるが、これに限定されない。

【0155】

本明細書で使用する場合、「配列同一性」または、例えば、「に50%同一である配列」を含む引用は、比較ウィンドウにわたって配列がヌクレオチドごとまたはアミノ酸ごとに同一である程度を指す。ゆえに、「配列同一性のパーセンテージ」は、2つの最適に整列された配列を比較ウィンドウにわたって比較し、一致する位置の数を得るために両配列において同一の核酸塩基 (例えば、A、T、C、G、I) または同一アミノ酸残基 (例えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys及びMet) が存在する位置の数を決定し、一致する位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数 (すなわち、ウィンドウサイズ) で割り、その結果に100を掛けることにより算出され得て、配列同一性のパーセンテージが得られる。本明細書に記載の参照配列のいずれかに対して、少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%配列同一性を有するヌクレオチド及びポリペプチドが含まれ、典型的にはポリペプチド変異体は、参照ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を維持する。

【0156】

2. ベクター、前駆体RNA、及び環状RNA

ある特定の態様では、3' スプライシング後グループイントロンフラグメント、任意選択で第1のスペーサー、内部リボソーム侵入部位 (IRES)、発現配列、任意選択で第2のスペーサー、及び5' スプライシング後グループイントロンフラグメントを含む環状RNAポリヌクレオチドを本明細書に提供する。一部の実施形態では、これらの領域は、この順序である。一部の実施形態では、環状RNAは、本明細書に提供する方法によって、または本明細書に提供するベクターから作製される。

【0157】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、（例えば、5'相同領域、3'グループエイントロンフラグメント、任意選択で第1のスペーサー、内部リボソーム侵入部位（IRES）、発現配列、任意選択で第2のスペーサー、5'グループエイントロンフラグメント、及び3'相同領域を含む）本明細書に提供するベクターの転写は、環状化することができる前駆体線状RNAポリヌクレオチドの形成をもたらす。一部の実施形態では、この前駆体線状RNAポリヌクレオチドは、グアノシンヌクレオチドまたはヌクレオシド（例えば、GTP）及び二価カチオン（例えば、 Mg^{2+} ）の存在下でインキュベートされる場合に環状化する。

【0158】

一部の実施形態では、本明細書に提供するベクター及び前駆体RNAポリヌクレオチドは、第1の（5'）二重鎖形成領域及び第2の（3'）二重鎖形成領域を含む。ある特定の実施形態では、第1及び第2の相同領域は、完全または不完全な二重鎖を形成し得る。ゆえに、ある特定の実施形態では、第1及び第2の二重鎖形成領域の少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%が、互いに塩基対形成し得る。一部の実施形態では、二重鎖形成領域は、RNA内の意図しない配列（例えば、非二重鎖形成領域配列）と50%未満（例えば、45%未満、40%未満、35%未満、30%未満、25%未満）の塩基対形成を有すると予測される。かかる二重鎖形成領域を前駆体RNA鎖の端に含み、グループエイントロンフラグメントに隣接するまたは非常に近接する一部の実施形態では、グループエイントロンフラグメントを互いに近接させ、スプライシング効率を増加させる。一部の実施形態では、二重鎖形成領域は、3~100ヌクレオチドの長さ（例えば、3~75ヌクレオチドの長さ、3~50ヌクレオチドの長さ、20~50ヌクレオチドの長さ、35~50ヌクレオチドの長さ、5~25ヌクレオチドの長さ、9~19ヌクレオチドの長さ）である。一部の実施形態では、二重鎖形成領域は、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、二重鎖形成領域は、約9~約50ヌクレオチドの長さを有する。一部の実施形態では、二重鎖形成領域は、約9~約19ヌクレオチドの長さを有する。一部の実施形態では、二重鎖形成領域は、約20~約40ヌクレオチドの長さを有する。ある特定の実施形態では、二重鎖形成領域は、約30ヌクレオチドの長さを有する。

【0159】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供するベクター、前駆体RNA及び環状RNAは、第1の（5'）及び／または第2の（3'）スペーサーを含む。一部の実施形態では、3'グループエイントロンフラグメント及びIRES間にスペーサーを含むことは、それらが相互作用するのを防ぎ、ゆえにスプライシング効率を増加させることによって、それらの領域における二次構造を保存し得る。一部の実施形態では、第1の（3'グループエイントロンフラグメント及びIRES間）及び第2の（発現配列及び5'グループエイントロンフラグメント間）スペーサーは、互いに塩基対形成し、第1及び第2の二重鎖形成領域に対してではないと予測される追加の塩基対形成領域を含む。一部の実施形態では、かかるスペーサー塩基対形成は、グループエイントロンフラグメントを互いに近接させ、スプライシング効率をさらに増加させる。加えて、一部の実施形態では、第1及び第2の二重鎖形成領域間の塩基対形成、及び別個に、第1及び第2のスペーサー間の塩基対形成の組み合わせは、塩基対形成の隣接領域に接するグループエイントロンフラグメントを含有するスプライシングバブルの形成を促進する（図25）。典型的なスペーサーは、以下の質：1）近位構造、例えば、IRES、発現配列、またはイントロンとの干渉を回避すると予測される；2）少なくとも7nt長であり、100nt以下である；3）3'イントロンフラグメントの後及びこれに近接している及び／または5'イントロンフラグメントの前及びこれに近接している位置にある；ならびに4）以下：a）少なくとも5nt長の非構造化領域、b）別のスペーサーを含む遠位配列に少なくとも5nt長の塩基対形成の領域、及

び c) スペーサーの配列に範囲が限定された少なくとも 7 nt 長の構造化領域のうちの 1 つまたは複数を含む、のうちの 1 つまたは複数に伴う連続した配列である。スペーサーは、非構造化領域、塩基対形成領域、ヘアピン／構造化領域、及びそれらの組み合わせを含む、いくつかの領域を有し得る。ある実施形態では、スペーサーは、高い GC 含量を伴う構造化領域を有する。ある実施形態では、スペーサー塩基内の領域は、同じスペーサー内の別の領域と対を形成する。ある実施形態では、スペーサー塩基内の領域は、別のスペーサー内の領域と対を形成する。ある実施形態では、スペーサーは、1 つまたは複数のヘアピン構造を含む。ある実施形態では、スペーサーは、4～12 ヌクレオチドのステム及び 2～10 ヌクレオチドのループを伴う 1 つまたは複数のヘアピン構造を含む。ある実施形態では、3' グループイントロンフラグメント及び IRES 間に追加のスペーサーが存在する。ある実施形態では、この追加のスペーサーは、IRES の構造化領域が 3' グループイントロンフラグメントの折り畳みに干渉することを防止する、またはこれが生じる程度を低下させる。一部の実施形態では、5' スペーサー配列は、少なくとも 7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25 または 30 ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、5' スペーサー配列は、100、90、80、70、60、50、45、40、35 または 30 ヌクレオチド以下の長さである。一部の実施形態では、5' スペーサー配列は、5 及び 50、10 及び 50、20 及び 50、20 及び 40、及び／または 25 及び 35 ヌクレオチド間の長さである。ある特定の実施形態では、5' スペーサー配列は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 または 50 ヌクレオチドの長さである。一実施形態では、5' スペーサー配列は、ポリ A 配列である。別の実施形態では、5' スペーサー配列は、ポリ AC 配列である。一実施形態では、スペーサーは、約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 100% ポリ AC 含量を含む。一実施形態では、スペーサーは、約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 100% ポリピリミジン (C/T または C/U) 含量を含む。

【0160】

ある特定の実施形態では、3' グループイントロンフラグメントは、3' スプライス部位ジヌクレオチド及び任意選択で少なくとも 1 nt の長さ (例えば、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 または 30 nt の長さ) 及び最大でエクソンの長さの隣接するエクソン配列を含む天然グループイントロンの 3' 近位フラグメントに対して少なくとも 75% 相同 (例えば、少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 相同) である連続配列である。典型的には、5' グループイントロンフラグメントは、5' スプライス部位ジヌクレオチド及び任意選択で少なくとも 1 nt の長さ (例えば、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 または 30 nt の長さ) 及び最大でエクソンの長さの隣接するエクソン配列を含む天然グループイントロンの 5' 近位フラグメントに対して少なくとも 75% 相同 (例えば、少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 相同) である連続配列である。Umekage et al. (2012) によって記載される、及び図 33 に示すように、3' グループイントロンフラグメント及び 5' グループイントロンフラグメントの外部部分は、環状化において除去され、本明細書に提供する環状 RNA は、少なくとも 1 nt の長さの任意選択のエクソン配列によって形成される 3' グループイントロンフラグメント及び少なくとも 1 nt の長さの任意選択のエクソン配列によって形成される 5' グループイントロンフラグメントの部分のみを含むようになるが、これはかかる配列が非環状化前駆体 RNA に存在する場合である。環状 RNA によって保持される 3' グループイントロンフラグメントの一部は、本明細書では、スプライシング後 3' グループイントロンフラグメントと称する。環状 RNA によって保

持される5'グループイントロンフラグメントの一部は、本明細書では、スプライシング後5'グループイントロンフラグメントと称する。

【0161】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供するベクター、前駆体RNA及び環状RNAは、内部リボソーム侵入部位(IRES)を含む。IRESを含めることにより、環状RNAからの1つまたは複数のオープンリーディングフレーム(例えば、発現配列を形成するオープンリーディングフレーム)の翻訳が可能になる。IRESエレメントは、真核生物のリボソーム翻訳開始複合体を引き付け、翻訳開始を促進する。例えば、Kaufman et al., Nuc. Acids Res. (1991) 19:4485-4490; Gurtu et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1996) 229:295-298; Rees et al., BioTechniques (1996) 20:102-110; Kobayashi et al., BioTechniques (1996) 21:399-402; 及び Mosser et al., BioTechniques 1997 22 150-161)を参照されたい。

【0162】

多数のIRES配列が利用可能であり、多種多様なウイルスに由来する配列、例えば脳筋炎ウイルス(EMCV)UTRなどのピコルナウイルスのリーダー配列(Jang et al., J. Virol. (1989) 63:1651-1660)、ポリオリーダー配列、A型肝炎ウイルスリーダー、C型肝炎ウイルスIRES、ヒトライノウイルス2型IRES(Dobrikova et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (2003) 100(25):15125-15130)、口蹄疫ウイルスからのIRESエレメント(Ramesh et al., Nucl. Acid Res. (1996) 24:2697-2700)、ジアルジアウイルスIRES(Garlapati et al., J. Biol. Chem. (2004) 279(5):3389-3397)などが含まれる。

【0163】

一部の実施形態では、IRESは、タウラ症候群ウイルス、トリアトーマウイルス、タイラー脳脊髄炎ウイルス、シミアンウイルス40、Solenopsis invictaウイルス1、Rhopalosiphum padiウイルス、細網内皮症ウイルス、ヒトポリオウイルス1、Plautia stali腸ウイルス、カシミールハチウイルス、ヒトライノウイルス2、Homalodisca coagulataウイルス-1、ヒト免疫不全ウイルス1型、ヒメトビPウイルス、C型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス、GB型肝炎ウイルス、口蹄疫ウイルス、ヒトエンテロウイルス71、ウマ鼻炎ウイルス、Ectropis obliquaピコルナ様ウイルス、脳筋炎ウイルス、ショウジョウバエCウイルス、ヒトコクサッキーウイルスB3、アブラナ科トバモウイルス、クリケット麻痺ウイルス、ウシウイルス性下痢ウイルス1、ブラッククイーンセルウイルス、アブラムシ致死麻痺ウイルス、トリ脳脊髄炎ウイルス、急性ミツバチ麻痺ウイルス、ハイビスカスクロロティックリングスポットウイルス、古典的ブタ熱ウイルス、ヒトFGF2、ヒトSFTPA1、ヒトAML1/RUNX1、ショウジョウバエアンテナペディア、ヒトAQP4、ヒトAT1R、ヒトBAG-1、ヒトBCL2、ヒトBiP、ヒトc-IAP1、ヒトc-myc、ヒトeIF4G、マウスNDST4L、ヒトLEF1、マウスHIF1アルファ、ヒトn.myc、マウスGtx、ヒトp27kip1、ヒトPDGF2/c-sis、ヒトp53、ヒトPim-1、マウスRbm3、ショウジョウバエReaper、イヌScamper、ショウジョウバエUbx、ヒトUNR、マウスUtrA、ヒトVEGF-A、ヒトXIAP、ショウジョウバエhairless、S. cerevisiae TFIID、S. cerevisiae YAP1、タバコエッチウイルス、カブクリンクルウイルス、EMCV-A、EMCV-B、EMCV-Bf、EMCV-Cf、EMCV pEC9、ピコビルナウイルス、HCV QC64、ヒトコサウイルスE/D、ヒトコサウイルスF、ヒトコサウイルスJMY、ライノウイルスNAT001、HRV14、HRV89、HRVC-02、HRV-A21、サリウイルスA SH1、

10

20

30

40

50

サリウイルスFHB、サリウイルスNG-J1、ヒトパレコウイルス1、クロヒウイルスB、Yc-3、ロサウイルスM-7、シャンバウイルスA、パシウイルスA、パシウイルスA 2、エコーウイルスE14、ヒトパレコウイルス5、アイチウイルス、A型肝炎ウイルスHA16、フォピウイルス、CVA10、エンテロウイルスC、エンテロウイルスD、エンテロウイルスJ、ヒトペギウイルス2、GBV-C GT110、GBV-C K1737、GBV-C Iowa、ペギウイルスA 1220、パシウイルスA 3、サペロウイルス、ロサウイルスB、バクンサウイルス、トレモウイルスA、ブタパシウイルス1、PLV-CHN、パシウイルスA、シシニウイルス、ヘパシウイルスK、ヘパシウイルスA、BVDV1、ボーダー病ウイルス、BVDV2、CSFV-PK15C、SF573ジシストロウイルス、湖北ピコルナ様ウイルス、CRPV、サリウイルスA BN5、サリウイルスA BN2、サリウイルスA 02394、サリウイルスA GUT、サリウイルスA CH、サリウイルスA SZ1、サリウイルスFHB、CVB3、CVB1、エコーウイルス7、CVB5、EVA71、CVA3、CVA12、EV24、またはeIF4Gに対するアプタマーのIRES配列である。

【0164】

一部の実施形態では、本明細書のポリヌクレオチドは、発現配列を含む。一部の実施形態では、発現配列は、CARをコードする。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つより多い発現配列、例えば、2、3、4、または5つの発現配列を含む。一部の実施形態では、あるかか発現配列は、CARをコードし、別のものは、別の治療用タンパク質、例えばチェックポイント阻害剤、例えば、PD-1阻害剤の阻害剤、PD-L1阻害剤、またはCTLA-4阻害剤をコードする。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、CARをコードする第1の発現配列及びプログラム細胞死1 (PD-1)、PD-L1、PD-L2、細胞傷害性Tリンパ球抗原4 (CTLA-4)、TIM-3、CEACAM (例えば、CEACAM-1、-3及び／または-5)、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GALS、アデノシン、TGFR (例えば、TGFRベータ)、B7-H1、B7-H4 (VTCN1)、OX-40、CD137、CD40、またはLAGSの阻害剤をコードする第2の発現配列を含む。一部の実施形態では、阻害剤は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、イピリムマブ、またはアテゾリズマブである。一部の実施形態では、発現配列は、2つ以上の機能単位、例えば、CAR及び別の治療用タンパク質に切断されるタンパク質をコードする。

【0165】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供するポリヌクレオチドは、CARまたはTCR複合体タンパク質コード領域を含む。CARまたはTCR複合体タンパク質コード領域は、キメラ抗原受容体 (CAR) または任意のT細胞受容体 (TCR) 複合体タンパク質をコードする配列である。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、CARをコードする。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質コード領域は、バイシストロン性コンストラクト中の2つのCARをコードする。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、TCRデルタ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3ゼータ、CD4、及び／またはCD8をコードする。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、人工TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、TCRデルタ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3ゼータ、CD4、及び／またはCD8変異体をコードする。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、天然TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、TCRデルタ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3ゼータ、CD4、及び／またはCD8変異体をコードする。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体コード領域は、終止コドンで終わる。一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体コード領域は、終止カセットで終わる。

10

20

30

40

50

【0166】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供するベクターは、3'UTRを含む。一部の実施形態では、3'UTRは、ヒトベータグロビン、ヒトアルファグロビン、ヒトセノプスベータグロビン、ヒトセノプスアルファグロビン、ヒトプロラクチン、ヒトGAP-43、ヒトEF1a1、ヒトTau、ヒトTNF α 、デングウイルス、ハンタウイルス小mRNA、ブニヤウイルス小mRNA、カプ黄色モザイクウイルス、C型肝炎ウイルス、風疹ウイルス、タバコモザイクウイルス、ヒトIL-8、ヒトアクチン、ヒトGAPDH、ヒトチューブリン、ハイビスカスクロロティックリングスポットウイルス(hibiscus chlorotic ringspot virus)、ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後制御エレメント、シンドビスウイルス、カプクリンウイルス、タバコエッチングウイルス、またはベネズエラウマ脳炎ウイルスに由来する。

10

【0167】

一部の実施形態では、本明細書に提供するベクターは、5'UTRを含む。一部の実施形態では、5'UTRは、ヒトベータグロビン、アフリカツメガエルベータグロビン、ヒトアルファグロビン、アフリカツメガエルアルファグロビン、ルベラウイルス、タバコモザイクウイルス、マウスGtx、デングウイルス、熱ショックタンパク質70kDaタンパク質1A、タバコアルコールデヒドロゲナーゼ、タバコエッチングウイルス、カプクリンウイルス、またはアデノウイルス三者リーダーに由来する。

【0168】

一部の実施形態では、本明細書に提供するベクターは、ポリA領域を含む。一部の実施形態では、ポリA領域は、少なくとも30ヌクレオチド長または少なくとも60ヌクレオチド長である。

20

【0169】

一部の実施形態では、本明細書に提供するDNA(例えば、ベクター)、線状RNA(例えば、前駆体RNA)、及び／または環状RNAポリヌクレオチドは、300~10000、400~9000、500~8000、600~7000、700~6000、800~5000、900~5000、1000~5000、1100~5000、1200~5000、1300~5000、1400~5000、及び／または1500~5000ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、少なくとも300nt、400nt、500nt、600nt、700nt、800nt、900nt、1000nt、1100nt、1200nt、1300nt、1400nt、1500nt、2000nt、2500nt、3000nt、3500nt、4000nt、4500nt、または5000ntの長さである。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、3000nt、3500nt、4000nt、4500nt、5000nt、6000nt、7000nt、8000nt、9000nt、または1000nt以下の長さである。一部の実施形態では、本明細書に提供するDNA、線状RNA、及び／または環状RNAポリヌクレオチドの長さは、約300nt、400nt、500nt、600nt、700nt、800nt、900nt、1000nt、1100nt、1200nt、1300nt、1400nt、1500nt、2000nt、2500nt、3000nt、3500nt、4000nt、4500nt、5000nt、6000nt、7000nt、8000nt、9000nt、または10000ntである。

30

40

【0170】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供するポリヌクレオチドは、環状RNAポリヌクレオチドである、または環状RNAポリヌクレオチドを作製するために有用である。かかるポリヌクレオチドは、CARまたはTCR複合体タンパク質コードドメインを含む。ある特定の現在のCAR及び組換えTCR処置は、CARまたは組換えTCRをコードするDNAで細胞を操作し、一時的な形態のCARまたは組換えTCR発現と比較してより大きな毒性を引き起こし、有害な突然変異誘発のリスクをもたらす。代替の方法は、CARまたは組換えTCR複合体タンパク質をコードする線状RNAである。ただし、線状RNAは、インビボでの半減期が短く、処置有効性が制限される。ある特定の実施形態では

50

、CARまたは組換えTCR複合体タンパク質をコードする本明細書に提供する環状RNAポリヌクレオチドは、線状RNAと比較した場合、処置の治療有効性を増加させる一方で、一過性発現の毒性利点を提供する。グループイントロンフラグメントに隣接する相同領域の追加を含む、本明細書に記載のRNAを環状化する方法は、高い環状化効率及び大きなRNAポリヌクレオチドの環状化を可能にする。

【0171】

一部の実施形態では、ベクターを本明細書に提供する。ある特定の実施形態では、ベクターは、以下の順序で、a) 5'相同領域、b) 3'グループイントロンフラグメント、c) 任意選択で、第1のスペーサー配列、d) IRES、e) 発現配列（例えば、CARまたはTCR複合体タンパク質コード領域）、f) 任意選択で、第2のスペーサー配列、g) 5'グループイントロンフラグメント、及びh) 3'相同領域を含む。一部の実施形態では、ベクターは、5'相同領域の上流に転写プロモーターを含む。

10

【0172】

一部の実施形態では、前駆体RNAを本明細書に提供する。ある特定の実施形態では、前駆体RNAは、本明細書に提供するベクターのインビトロ転写によって産生される線状RNAである。一部の実施形態では、前駆体RNAは、以下の順序で、a) 5'相同領域、b) 3'グループイントロンフラグメント、c) 任意選択で、第1のスペーサー配列、d) IRES、e) 発現配列（例えば、CARまたはTCR複合体タンパク質コード領域）、f) 任意選択で、第2のスペーサー配列、g) 5'グループイントロンフラグメント、及びh) 3'相同領域を含む。前駆体RNAは、未修飾である、部分的に修飾される、または完全に修飾されることができる。

20

【0173】

ある特定の実施形態では、環状RNAを本明細書に提供する。ある特定の実施形態では、環状RNAは、本明細書に提供するベクターによって産生される環状RNAである。一部の実施形態では、環状RNAは、本明細書に提供する前駆体RNAの環状化によって産生される環状RNAである。一部の実施形態では、環状RNAは、以下の配列で、a) 第1のスペーサー配列、b) IRES、c) 発現配列（例えば、CARまたはTCR複合体タンパク質コード領域）、及びd) 第2のスペーサー配列を含む。一部の実施形態では、環状RNAは、3'スプライス部位の3'である3'グループイントロンフラグメントの部分を含み。一部の実施形態では、環状RNAは、5'スプライス部位の5'である5'グループイントロンフラグメントの部分を含み。一部の実施形態では、環状RNAは、少なくとも500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000または4500ヌクレオチドのサイズである。環状RNAは、未修飾である、部分的に修飾される、または完全に修飾されることができる。

30

【0174】

一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、同じ発現配列を含むmRNAよりも高い機能安定性を有する。一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、同じ発現配列、5mou修飾、最適化UTR、キャップ、及び／またはポリAテールを含むmRNAよりも高い機能安定性を有する。

40

【0175】

一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAポリヌクレオチドは、少なくとも5時間、10時間、15時間、20時間、30時間、40時間、50時間、60時間、70時間または80時間の機能的半減期を有する。一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAポリヌクレオチドは、5～80、10～70、15～60、及び／または20～50時間の機能的半減期を有する。一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAポリヌクレオチドは、同じタンパク質をコードする同等の線状RNAポリヌクレオチドよりも長い（例えば、少なくとも1.5倍長い、少なくとも2倍長い）機能的半減期を有する。一部の実施形態では、機能的半減期は、機能的タンパク質合成の検出を通して評価することができる。

50

【0176】

一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAポリヌクレオチドは、少なくとも5時間、10時間、15時間、20時間、30時間、40時間、50時間、60時間、70時間または80時間の半減期を有する。一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAポリヌクレオチドは、5～80、10～70、15～60、及び／または20～50時間の半減期を有する。一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAポリヌクレオチドは、同じタンパク質をコードする同等の線状RNAポリヌクレオチドよりも長い（例えば、少なくとも1.5倍長い、少なくとも2倍長い）半減期を有する。

【0177】

一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、同等の線状mRNAよりも高い程度の発現、例えば、細胞へのRNAの投与24時間後により高い程度の発現を有し得る。一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、同じ発現配列、5' m^oU修飾、最適化UTR、キャップ、及び／またはポリAテールを含むmRNAよりも高い程度の発現を有する。一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、同等の線状mRNAよりも高い安定性を有し得る。一部の実施形態では、これは、エレクトロポレーション後のインビトロまたはインビボでの受容体の存在及び密度を測定することによって示され得、1週間にわたる時点で測定される。一部の実施形態では、これは、qPCRまたはISHを介してRNAの存在を測定することによって示され得る。

【0178】

一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞に曝露された場合、同等のmRNAよりも免疫原性が低くあり得る。一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞に曝露された場合、サイトカインの産生の調節に関連している。例えば、一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞に曝露された場合、同じ発現配列を含むmRNAと比較して、IFN-β1、RIG-1、IL-2、IL-6、IFNγ、及び／またはTNFαの産生の低下に関連している。一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、生物の免疫系またはある特定のタイプの免疫細胞に曝露された場合、同じ発現配列を含むmRNAと比較して、より少ないIFN-β1、RIG-1、IL-2、IL-6、IFNγ、及び／またはTNFαの転写産物誘導に関連している。一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、同じ発現配列を含むmRNAよりも免疫原性が低い。一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、同じ発現配列、5' m^oU修飾、最適化UTR、キャップ、及び／またはポリAテールを含むmRNAよりも免疫原性が低い。ある特定の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、サイトカイン放出症候群（CRS）のために、免疫細胞、例えば、T細胞上でCARまたはTCR複合体タンパク質を発現する場合、DNAを使用するウイルス、例えば、レンチウイルス操作よりも低い毒性をもたらし得る。一部の実施形態では、これは、ELISA及び／またはqPCRによって評価して、インビトロでのサイトカイン、例えば、IL6放出後感染／トランスフェクションを測定することによって示され得る。

【0179】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、サイトカイン放出症候群（CRS）のために、免疫細胞、例えば、T細胞上でCARまたはTCR複合体タンパク質を発現する場合、DNAを使用するウイルス、例えば、レンチウイルス操作よりも低い毒性をもたらし得る。一部の実施形態では、これは、ELISA及び／またはqPCRによって評価して、インビトロでのサイトカイン、例えば、IL6放出後感染／トランスフェクションを測定することによって示され得る。

【0180】

一部の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、環状RNAによる挿入突然変異誘発の欠如のために、免疫細胞、例えば、T細胞上でCARまたはTCR複合体タンパク質を発現する場合、DNAを使用するウイルス、例えば、レンチウイルス操作よりも低

10

20

30

40

50

い毒性をもたらし得る。一部の実施形態では、これは、環状RNAがゲノムに組み込まれない一方で、レンチウイルスによって送達されるDNAがゲノムに組み込まれることを、環状RNAまたはDNAを投与した後に配列決定することによって実証することによって示され得る。ある特定の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、そのまま細胞へとトランスフェクトすることができる、またはDNAベクターの形でトランスフェクトされて細胞内で転写されることができる。トランスフェクトされたDNAベクターからの環状RNAの転写は、追加のポリメラーゼまたは細胞にトランスフェクトされた核酸によってコードされるポリメラーゼを介する、または好ましくは内因性ポリメラーゼを介することができる。

【0181】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAポリヌクレオチドは、修飾RNAヌクレオチド及び／または修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、 m^5C (5-メチルシチジン) である。別の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、 m^5U (5-メチルウリジン) である。別の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、 m^6A (N^6 -メチルアデノシン) である。別の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、 s^2U (2-チオウリジン) である。別の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、 Ψ (シュードウリジン) である。別の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、 Um (2'-O-メチルウリジン) である。他の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、 m^1A (1-メチルアデノシン) ; m^2A (2-メチルアデノシン) ; Am (2'-O-メチルアデノシン) ; m^2m^6A (2-メチルチオ- N^6 -メチルアデノシン) ; i^6A (N^6 -イソペンテニルアデノシン) ; ms^2i^6A (2-メチルチオ- N^6 -イソペンテニルアデノシン) ; io^6A (N^6 - (シス-ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン) ; ms^2io^6A (2-メチルチオ- N^6 - (シス-ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン) ; g^6A (N^6 -グリシニルカルバモイルアデノシン) ; t^6A (N^6 -トレオニルカルバモイルアデノシン) ; ms^2t^6A (2-メチルチオ- N^6 -トレオニルカルバモイルアデノシン) ; m^6t^6A (N^6 -メチル- N^6 -トレオニルカルバモイルアデノシン) ; hn^6A (N^6 -ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン) ; ms^2hn^6A (2-メチルチオ- N^6 -ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン) ; $Ar(p)$ (2'-O-リボシルアデノシン (ホスフェート)) ; I (イノシン) ; m^1I (1-メチルイノシン) ; m^1Im (1, 2'-O-ジメチルイノシン) ; m^3C (3-メチルシチジン) ; Cm (2'-O-メチルシチジン) ; s^2C (2-チオシチジン) ; ac^4C (N^4 -アセチルシチジン) ; f^5C (5-ホルミルシチジン) ; m^5Cm (5, 2'-O-ジメチルシチジン) ; ac^4Cm (N^4 -アセチル-2'-O-メチルシチジン) ; k^2C (ライシジン) ; m^1G (1-メチルグアノシン) ; m^2G (N^2 -メチルグアノシン) ; m^7G (7-メチルグアノシン) ; Gm (2'-O-メチルグアノシン) ; m^2_2G (N^2 , N^2 -ジメチルグアノシン) ; m^2Gm (N^2 , 2'-O-ジメチルグアノシン) ; m^2_2Gm (N^2 , N^2 , 2'-O-トリメチルグアノシン) ; $Gr(p)$ (2'-O-リボシルグアノシン (ホスフェート)) ; yW (ワイブトシン) ; o_2yW (ペルオキシワイブトシン) ; $OH yW$ (ヒドロキシワイブトシン) ; $OH yW^*$ (未修飾ヒドロキシワイブトシン) ; imG (ワイオシン) ; $mimG$ (メチルワイオシン) ; Q (キューオシン) ; oQ (エポキシキューオシン) ; $galQ$ (ガラクトシル-キューオシン) ; $manQ$ (マンノシル-キューオシン) ; $preQ_0$ (7-シアノ-7-デアザグアノシン) ; $preQ_1$ (7-アミノメチル-7-デアザグアノシン) ; G^+ (アルカエオシン) ; D (ジヒドロウリジン) ; m^5Um (5, 2'-O-ジメチルウリジン) ; s^4U (4-チオウリジン) ; m^5s^2U (5-メチル-2-チオウリジン) ; s^2Um (2-チオ-2'-O-メチルウリジン) ; acp^3U (3- (3-アミノ-3-カルボキシプロピル) ウリジン) ; ho^5U (5-ヒドロキシウリジン) ; mo^5U (5-メトキシウリジン) ; cmo^5U (ウリジン5-オキシ酢酸) ; $mcmo^5U$ (ウリジン5-オキシ酢酸メチルエステル) ; chm^5U (5- (カルボキシヒドロキシメチル) ウリジン) ; $mchm^5U$ (5- (カルボキシヒドロキシメチル) ウリジンメチルエステル) ; mcm^5U (5-メトキシカルボニルメチルウリジン) ; mcm^5Um (

10

20

30

40

50

5-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチルウリジン) ; $m c n^{\bar{n}} s^2 U$ (5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン) ; $n m^5 S^2 U$ (5-アミノメチル-2-チオウリジン) ; $m n m^5 U$ (5-メチルアミノメチルウリジン) ; $m n m^5 s^2 U$ (5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン) ; $m n m^5 s e^2 U$ (5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン) ; $n c m^5 U$ (5-カルバモイルメチルウリジン) ; $n c m^5 U m$ (5-カルバモイルメチル-2'-O-メチルウリジン) ; $c m n n^{\bar{n}} U$ (5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン) ; $c m n m^5 U m$ (5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-O-メチルウリジン) ; $c m n n^{\bar{n}} s^2 U$ (5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン) ; $m^6_2 A$ (N^6 , N^6 -ジメチルアデノシン) ; $I m$ (2'-O-メチルイノシン) ; $m^4 C$ (N^4 -メチルシチジン) ; $m^4 C m$ (N^4 , 2'-O-ジメチルシチジン) ; $h m^5 C$ (5-ヒドロキシメチルシチジン) ; $m^3 U$ (3-メチルウリジン) ; $c m^5 U$ (5-カルボキシメチルウリジン) ; $m^6 A m$ (N^6 , 2'-O-ジメチルアデノシン) ; $m^6_2 A m$ (N^6 , N^6 , O-2'-トリメチルアデノシン) ; $n^{\bar{n}}, ^7 G$ (N^2 , 7-ジメチルグアノシン) ; $m^2, ^2, ^7 G$ (N^2 , N^2 , 7-トリメチルグアノシン) ; $m^3 U m$ (3, 2'-O-ジメチルウリジン) ; $n^{\bar{n}} D$ (5-メチルジヒドロウリジン) ; $f^5 C m$ (5-ホルミル-2'-O-メチルシチジン) ; $n^{\bar{n}} G m$ (1, 2'-O-ジメチルグアノシン) ; $m^1 A m$ (1, 2'-O-ジメチルアデノシン) ; $\tau n^{\bar{n}} U$ (5-タウリノメチルウリジン) ; $\tau m^5 s^2 U$ (5-タウリノメチル-2-チオウリジン) ; $i m G-14$ (4-デメチルワイオシン) ; $i m G2$ (イソワイオシン) ; または $a c^6 A$ (N^6 -アセチルアデノシン) である。

【0182】

一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、ピリジン-4-オンリボヌクレオシド、5-アザ-ウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオウリジン、4-チオ-シュードウリジン、2-チオ-シュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、5-カルボキシメチル-ウリジン、1-カルボキシメチル-シュードウリジン、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピニル-シュードウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン、1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン、5-メチル-ウリジン、1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、5-アザ-シチジン、シュードイソシチジン、3-メチル-シチジン、 N^4 -アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、 N^4 -メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、1-メチル-シュードイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-シュードイソシチジン、2-チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン、5-アザ-2-チオ-ゼブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メトキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-シュードイソシチジン、4-メトキシ-1-メチル-シュードイソシチジン、2-アミノプリン、2, 6-ジアミノプリン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン、7-デアザ-2, 6-ジアミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2, 6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、 N^6 -メチルアデノシン、 N^6 -イソペンテニルアデノシン、 N^6 - (シス-ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン、2-メチルチオ- N^6 - (シス-ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン、 N^6 -グリシニルカルバモイルアデノシン、 N^6 -スレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ- N^6 -スレオニルカルバモイルアデノシン、 N^6 , N^6 -ジメチルア

デノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオアデニン、2-メトキシアデニン、イノシン、1-メチルイノシン、ワイオシン、ワイプトシン、7-デアザグアノシン、7-デアザ-8-アザグアノシン、6-チオグアノシン、6-チオ-7-デアザグアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザグアノシン、7-メチルグアノシン、6-チオ-7-メチルグアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシグアノシン、1-メチルグアノシン、N2-メチルグアノシン、N2, N2-ジメチルグアノシン、8-オキソグアノシン、7-メチル-8-オキソグアノシン、1-メチル-6-チオグアノシン、N2-メチル-6-チオグアノシン、及びN2, N2-ジメチル-6-チオグアノシンの群から選択される化合物を含み得る。別の実施形態では、修飾は、5-メチルシトシン、シュードウリジン及び1-メチルシュードウリジンからなる群から独立して選択される。

10

【0183】

一部の実施形態では、修飾リボヌクレオシドは、5-メチルシチジン、5-メトキシウリジン、1-メチルシュードウリジン、N6-メチルアデノシン、及び／またはシュードウリジンを含む。一部の実施形態では、かかる修飾ヌクレオシドは、さらなる安定性及び免疫活性化に対する耐性を提供する。

【0184】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、コドン最適化され得る。コドン最適化配列は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのコドンが、ポリペプチドの発現、安定性及び／または活性を増加させるために、置換されている配列であり得る。コドン最適化に影響を与える因子には、(i) 2つ以上の生物もしくは遺伝子または合成的に構築されたバイアステーブル間のコドンバイアスの変動、(ii) 生物、遺伝子、または遺伝子のセット内のコドンバイアスの程度の変動、(iii) 状況を含むコドンの系統的変動、(iv) それらのデコードtRNAに従ったコドンの変動、(v) トリプレットの全体的または1つの位置のいずれかで、GC%に従ったコドンの変動、(vi) 例えば天然に存在する配列のような参照配列に対する類似度の変動、(vii) コドン頻度カットオフの変動、(viii) DNA配列から転写されたmRNAの構造特性、(ix) コドン置換セットの設計に基づくDNA配列の機能に関する事前知識、及び／または(x) 各アミノ酸のコドンセットの系統的変動のうちの1つまたは複数が含まれるが、これに限定されない。一部の実施形態では、コドン最適化ポリヌクレオチドは、リボザイム衝突を最小化し得る及び／または発現配列及びIRES間の構造的干渉を制限し得る。

20

30

【0185】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、細胞の内側で産生される。一部の実施形態では、前駆体RNAは、バクテリオファージRNAポリメラーゼによって細胞質中で、または宿主RNAポリメラーゼIIによって核内で、DNAテンプレートを使用して（例えば、一部の実施形態では、本明細書に提供するベクターを使用して）転写され、次に環状化される。

【0186】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、環状RNA分子によってコードされるポリペプチド（例えば、CARまたはTCR複合体タンパク質）が動物の内側で発現されるように、動物（例えば、ヒト）に注射される。

40

【0187】

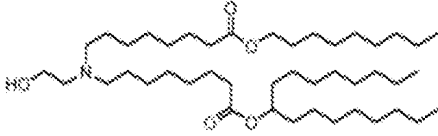
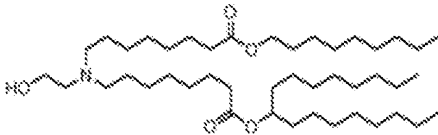
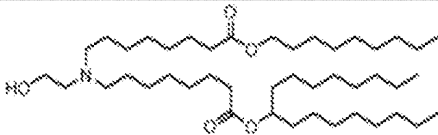
3. ペイロード

一部の実施形態では、発現配列は、治療用タンパク質をコードする。一部の実施形態では、治療用タンパク質は、表1に列挙されたタンパク質から選択される。

【0188】

（表1）タンパク質発現配列及び送達製剤

50

ペイロード	配列	標的細胞 / 器官	好ましい送達製剤
CD19 CAR	配列番号309～314のいずれか	T 細胞	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) β シトステロール (28.5% mol %) コレステロール (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)
BCMA CAR	MALPVTALLLPLALLLHAAR PDIVLTQSPASLAVSLGERAT INCREASESVSVIGAHLIHWY QQKPGQPPKLLIYLASNLET GVPARFSGSGSGTDFLTISS LQAEDAAIYYCLQSRIFPRTF GQGTKLEIKGSTSGSGKPGS GEGSTKGQVQLVQSGSELK KPGASVKVSCKASGYTFTDY SINWVRQAPGQGLEWMGWI NTETREPAYAYDFRGRFVS LDTSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARDYSYAMDYWGQG TLVTVSSAAATTPAPRPPTP APTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRG RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCELR VKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEG YNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR	T 細胞	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) β シトステロール (28.5% mol %) コレステロール (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)
MAGE- A4 TCR	TCRアルファ鎖: KNQVEQSPQSLILEGKNCTL QCNYTVSPFSNLRWYKQDT GRGPVSLTIMTFSENTKSNG	T 細胞	

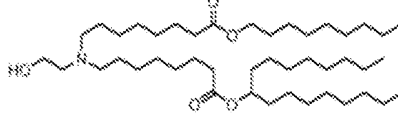
10

20

30

40

50

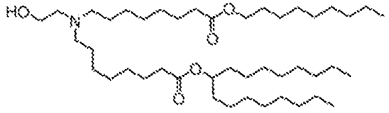
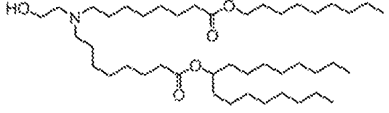
	RYTATLDADTKQSSLHITAS QLSDSASYICVVNHSGGSYIP TFGRGTS LIVHPYIQKPDPAV YQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKSDSVYITDKTV LDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPS PESS TCR ベータ鎖: DVKVTQSSRYLVKRTGEKV FLECVQDMDHENMFWYRQ DPGLGLRLIYFSYDVKMKEK GDIPEGYSVSREKKERFSLIL ESASTNQTSMYLCASSFLMT SGDPYEQYFGPGTRLTVTED LKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYPDHVEL SWWVNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNPRNHFRCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVTQIV SAEAWGRAD		(50 mol %) DSPC (10 mol %) β シトステロール (28.5% mol %) コレステロール (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)
NY- ESO TCR	TCR アルファ 細胞外配列 MQEVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDP GKGLTSLLLIQSSQREQTSGR LNASLDKSSGRSTLYIAASQP GDSATYLCAVRPTSGGSYIP TFGRGTS LIVHPY TCR ベータ 細胞外配列 MGVTQTPKFQVLKTGQSMT LQCAQDMNHEYMSWYRQD PGMGLRLIHYSVGAGITDQG EVPNGYNVSRSTTEDFPLRL LSAAPSQTSVYFCASSYVGN TGELFFGEGSRLTVL	T 細胞	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) β シトステロール (28.5% mol %) コレステロール (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)
EPO	APPRLICDSRVLERYLLEAKE AENITTGCAEHCSLNENITVP DTKVNIFYAWKRMEVGQQA VEVWQGLALLSEAVLRGQA LLVNSSQPWEPLQLHVDKA VSGLRSLTLLRALGAQKEA ISPPDAASAAPLRTITADTFR KLFRVYSNFLRGKCLKLYTGE ACRTGDR	腎臓 または 骨髄	

10

20

30

40

PAH	MSTAVLENPGLGRKLSDFGQ ETSYIEDNCNQNGAISLIFSL KEEVGALAKVLRLEENDV NLTHIESRPSRLKKDEYEFFT HLDKRSPLALTNIILRHDI ATVHELSDRDKKDTVPWFP RTIQELDRFANQILSYGAELD ADHPGFKDPVYRARRKQFA DIAYNYRHGQPIPRVEYMEE EKKTWGTVEFKTLKSLYKTH ACYEYNHIFPLLEKYCGFHE DNIPQLEDVVSQFLQTCTGFRL RPVAGLLSSRDFLGGLAFRV FHCTQYIRHGSKPMYTPEPDI CHELLGHVPLFSDRSFAQFS QEIGLASLGAPDEYIEKLATI YWFTVEFGLCKQGDSIKAY GAGLLSSFGEQYCLSEKPK LLPLELEKTAIQNYTVTEFQP LYYVAESFNDAKEKVRNFA ATIPRPFSVRYDPYTQRIEVL DNTQQLKILADSINSEIGILCS ALQKIK	肝細胞	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) コレステロール (38.5% mol %) PEG-DMG (1.5%) または MC3 (50 mol %) DSPC (10 mol %) コレステロール (38.5% mol %) PEG-DMG (1.5%)
CPS1	LSVKAQTAHIVLEDGTKMK GYSFGHPSSVAGEVVFNGL GGYPEAITDPAYKGQILTMA NPIIGNGGAPDPTALDELGLS KYLESENGIKVSGLLVLDYSK DYNHWLATKSLGQWLQEEK VPAIYGVDTRMLTKIIRDKG TMLGKIEFEGQPVDFVDPNK QNLIAEVSTKDVKVYGKGN PTKVVAVDCGIKNNVIRLLV KRGAEVHLVPWNHDFTKME YDGILIAGGPGNPALAEPLIQ NVRKILESDDRKEPLFGISTGN LITGLAAGAKTYKMSMANR GQNQPVLNITNKQAFITAQN HGYALDNTLPAGWKPLFVN VNDQTNNEGIMHESKPFFAVQ FHPEVTPGPIDTEYLFDSFFSL IKKGKATTITSVLPKALVAS RVEVSKVLILGSGGLSIGQA GEFDYSGSQAVKAMKEENV KTVLMNPNIASVQTNEVGLK QADTVYFLPITPQFVTEVIKA EQPDGLILGMGGQTALNCG VELFKRGVLKEYGVKVLGT SVESIMATEDRQLFSDKLNEI	肝細胞	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) コレステロール (38.5% mol %) PEG-DMG (1.5%) または MC3 (50 mol %) DSPC (10 mol %) コレステロール (38.5% mol %) PEG-DMG (1.5%)

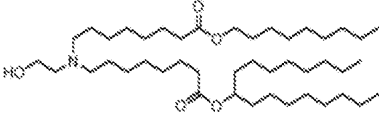
10

20

30

40

40

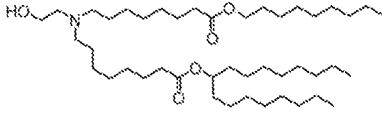
Cas9	MKRNYILGLDIGITSVGYGII DYETRDVIDAGVRLFKEANV ENNEGRRSKRGARRLKRRR RHRIQRVKKLLFDYNLLTDH SELSGINPYEARVKGLSQKLS EEEFSAALLHLAKRRGVHNV NEVEEDTGNELSTKEQISRNS KALEEKYVAELQLERLKKD GEVRGSINRFKTSDYVKEAK QLLKVQKAYHQLDQSFIDTY IDLLETRRTYYEGPGEGSPFG WKDIKEWYEMLMGHCTYFP EELRSVKYAYNADLYNALN DLNNLVITRDENEKLEYEYK FQIENVFKQKKKPTLKQIAK EILVNEEDIKGYRVTSTGKPE FTNLKVYHDIKDITARKEIIE NAELLDQIAKILTIYQSSEDIQ EELTNLNSELTSQEEIEQISNL KGYTGTHNLSLKAINLILDEL WHTNDNQIAIFNRLKLVPKK VDLSQQKEIPTTLVDDFILSP VVKRSFIQSIKVINAIKKYGL PNDIIJELAREKNSKDAQKMI NEMQKRNRQTNERIEEIJRTT GKENAKYLIEKIKLHDMQEG KCLYSLEAIPLEDLLNNPFNY EVDHIIPRSVSFDNSFNKVL VKQEENSKKGNRTPFQYLSS SDSKISYETFKKHILNLAGK GRISKTKKEYLLEERDINRFS VQKDFINRNLVDTRYATRGL MNLLRSYFRVNNLDVKVKS NGGFTSFLRRKWKFKKERN KGYKHAEDALIANADFIF KEWKKLDKAKKVMENQMF EEKQAESMPEIETEQEYKEIF ITPHQIKHIKDFKDYKYSHRV DKKPNRELINDTLYSTRKDD KGNTLIVNNLNGLYDKDND KLKKLINKSPEKLLMYHHDP QTYQKLKLIMEQYGDEKNP LYKYEEETGNYLTKYSKKD NGPVIKKIKYYGNKLNAHLD ITDDYPNSRNKVVKLCLKPY RFDVYLDNGVYKFVTVKNL DVIKKENYYEVNSKCYEEA KKLKKISNQAEFIASFYNND LIKINGELYRVIGVNNDLLNR	免疫細胞	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) β シトステロール (28.5% mol %) コレステロール (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)
------	---	------	---

10

20

30

40

	IEVNMIDITYREYLENMNDK RPPRIIKTIASKTQSIKKYSTD ILGNLYEVKSKKHPQIIKKG		
ADAM TS13	AAGGILHLELLVAVGPDVFQ AHQEDTERYVLTNLNIGAEL LRDPSLGAQFRVHLVKMVIL TEPEGAPNITANLTSSLLSVC GWSQTINPEDDTDPGHADLV LYITRFDLELPDGNRQVRGV TQLGGACSPWWSCLITEDTG FDLGVITIAHEIGHSFGLEHDG APGSGCGPSGHVMSDGA PRAGLAWSPCSRRLSLLS AGRARCVDPPRPQGSAG HPPDAQPLYYSANEQCRV AFGPKAVACTFAREHDMC QALSCHTDPLDQSSCSRLV PLLDGTECGVEKWCSKGRC RSLVELTPIAAVHGRWSSWG PRSPCSRSCGGGVVTRRRQC NNPRPAFGGRACVGADLQA EMCNTQACEKTQLEFMSQQ CARTDGQPLRSSPGGASFYH WGAAPHSQGDALCRHMC RAIGESFIMKRGSFLDGTRC MPSGPREDGTLSCVSGSCR TFGCDGRMDSQQVWDRCQ VCGGDNSTCSPRKGSTAGR AREYVTFLTVTPNLTSVYIA NHRPLFTHLAVRIGGRYVVA GKMSISPNTTYPSSLEDGRV EYRVALTEDRLPRLEEIRIWG PLQEDADIQVYRRYGEEYGN LTRPDITFTYFQPKPRQAWV WAAVRGPCSVSCGAGLRWV NYSCLDQARKELVETVQCQ GSQQPPAWPEACVLEPCPPY WAVGDFGPCSASCGGGLRE RPVRCVEAQGSLLKTLPPAR CRAGAQQPAVALETCNPQP CPARWEVSEPSSCTSAGGAG LALENETCVPGADGLEAPVT EGPGSVDEKLPAPEPCVGMS CPPGWGHLDATSAGEKAPSP WGSIRTGAQAAHVWTPAAG SCSVSCGRGLMELRFLCMDS ALRVVPVQEELCGLASKPGSR REVCQAVPCPARWQYKLAA CSVSCGRGVVRRILYCARAH	肝細胞	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) コレステロール (38.5% mol %) PEG-DMG (1.5%) または MC3 (50 mol %) DSPC (10 mol %) コレステロール (38.5% mol %) PEG-DMG (1.5%)

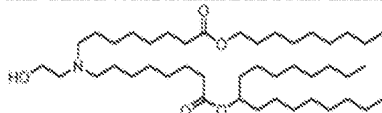
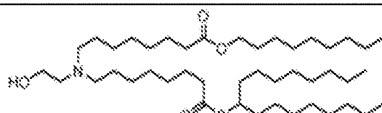
10

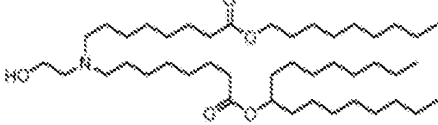
20

30

40

50

	GEDDGEEILLDTQCQGLPRP EPQEACSLPCPPRWKVM SLGPCSASCGLGTARRSVACVQ LDQGGQDVEVDEAACAALVR PEASVPCLIADCTYRWHVGT WMECSVSCGDGIQRRRDTC LGPQAQAPVPADFCQHLPKP VTVRGCWAGPCVGQGTPSL VPHEEAAAAPGRTTATPAGAS LEWSQARGLLFSPAPQPRRL LPGPQENSVQSSACGRQHLE PTGTIDMRGPGQADCAVAIG RPLGEVVTLRVLESSLNCSA GDMLLLWGRLTWRKMCRK LLDMTFSSKTNLTVVRQRCG RPGGGVLLRYGSQ LAPETFY RECDMQLFGPWGEIVSPSL PATSNAGGCRLFINVAPHARI AIHALATNMGAGTEGANAS YILIRDTHSLRTTAFHGQQVL YWESESSQAEMEFSEGFLKA QASLRGQYWTLQSWVPEMQ DPQSWKGKEGT			10
FOXP3	MPNPRPGKPSAPSLALGPSP GASPSWRAAPKASDLLGAR GPGGTFQGRDLRGGAHASS SLNPMPPSQLQLPTLPLVMV APSGARLGPLPHLQALLQDR PHFMHQLSTVDAHARTPVL QVHPLESPAMISLTPPTTATG VFSLKARPGLPPIVASLE WVSREPALLCTFPNPSAPRK DSTLSAVPQSSYPLLAVGC KWPGCEKVFEEDFLKHCQ ADHLLDEKGRAQCLLQREM VQSLEQQLVLEKEKLSAMQ AHLAKMALKASSVASSD KGSCCIVAAGSQGPVPAWS GPREADSLFAVRRHLWGS HGNSTFPEFLHNMDYFKFHN MRPPFTYATLIRWAILEAPEK QRTLNEIYHWFTRMF AFRN HPATWKN AIRHNLSLHKCFV RVESEKGAVWTVDELEFRK KRSQRPSRCSNPTPGP	免疫細胞	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) β シトステロール (28.5% mol %) コレステロール (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)	20
IL-10	SPGQGTQSENSCTHFPGNLP NMLRDLRDAFSRVKTFFQM KDQLDNLLLKESLLEDFKGY LGCQALSEMIQFYLEEVMQ	免疫細胞		30
				40

	AENQDPDIKAHVNSLGENLK TLRLRLRRCHRFLPCENKSK AVEQVKNAFNKLQEKGIIYK AMSEFDIFINYIEAYMTMKIR N		(50 mol %) DSPC (10 mol %) β シトステロール (28.5% mol %) コレステロール (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)
IL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLD LQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVNLNAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWI TFCQSIISTLT	免疫細胞	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) β シトステロール (28.5% mol %) コレステロール (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)

10

【0189】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つより多い遺伝子によってコードされるサブユニットから構成されるタンパク質をコードする。例えば、タンパク質は、タンパク質の各鎖またはサブユニットが別個の遺伝子によってコードされているヘテロダイマーであり得る。1つより多いcircRNA分子が輸送ビヒクルにて送達され、各circRNAがタンパク質の別個のサブユニットをコードすることが可能である。あるいは、単一のcircRNAを操作して、1つより多いサブユニットをコードし得る。ある特定の実施形態では、個々のサブユニットをコードする別個のcircRNA分子は、別個の輸送ビヒクルにて投与され得る。

20

【0190】

4. イオン化可能脂質

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の標的細胞への環状RNAの送達及び放出を、（例えば、かかる標的細胞の脂質膜に浸透するまたはこれと融合することによって）容易にするまたは向上するために輸送ビヒクルの成分として使用され得る脂質を本明細書に開示する。

30

【0191】

一部の実施形態では、脂質または輸送ビヒクルは、国際特許出願番号PCT/US2010/061058の32～55頁、米国出願公開番号US2019/0314524の段落86～117、国際特許出願番号PCT/US2018/058555の43～146頁、国際特許出願番号PCT/US2018/053569の46～51頁、国際特許出願番号PCT/US2017/028981の段落195～217、米国出願公開番号US2019/0321489の段落82～95、米国出願公開番号US2019/0314284の段落5～19及び／または38～77、国際特許出願番号PCT/US2019/025246の表1～4、米国出願公開第20190091164号の段落92～107、国際特許出願番号PCT/US2019/015913の78～97、109～164、及び／または190～217頁（それぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているような脂質である。

40

【0192】

一部の実施形態では、脂質または輸送ビヒクルは、イオン化可能脂質である。ある特定の実施形態では、イオン化可能脂質は、1つまたは複数の切断可能な官能基（例えば、ジスルフィド）を含み、これは、例えば、化合物の親水性官能頭部基の親油性官能尾部基からの解離（例えば、酸化的、還元的または酸性条件への曝露の際）を可能にし、それにより、1つまたは複数の標的細胞の脂質二重層における相転移を容易にする。一部の実施形態では、イオン化可能脂質は、式1によって表される、または米国特許第9,708,628号の表1もしくは2（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）

50

に列挙される脂質である。一部の実施形態では、イオン化可能脂質は、米国特許第 9, 765, 022 号の 7～13 頁に記載されている、または米国特許第 9, 765, 022 号の式 1（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）によって表されている。一部の実施形態では、イオン化可能脂質は、国際特許出願番号 PCT/US2019/016362 の 12～24 頁に記載されている、または国際特許出願 PCT/US2019/016362 の式 1（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）によって表されている。

【0193】

一部の実施形態では、脂質または輸送ビヒクルは、国際特許出願番号 PCT/US2010/061058、PCT/US2018/058555、PCT/US2018/053569、PCT/US2017/028981、PCT/US2019/025246、PCT/US2019/015913、PCT/US2019/016362、PCT/US2019/016362、米国出願公開番号 US2019/0314524、US2019/0321489、US2019/0314284、及び US2019/0091164、ならびに米国特許第 9, 708, 628 号及び同第 9, 765, 022 号（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているような脂質である。

【0194】

一部の実施形態では、1 つまたは複数の標的細胞への環状 RNA の送達及び放出を容易にするまたは向上するための輸送ビヒクルの成分として使用され得る脂質は、表 2 に列挙された 1 つまたは複数の脂質であり得る。

【0195】

（表 2）例示的な脂質

番号	脂質構造
1	

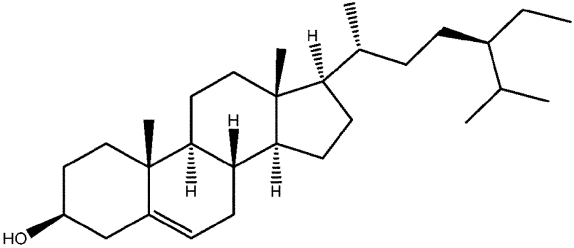
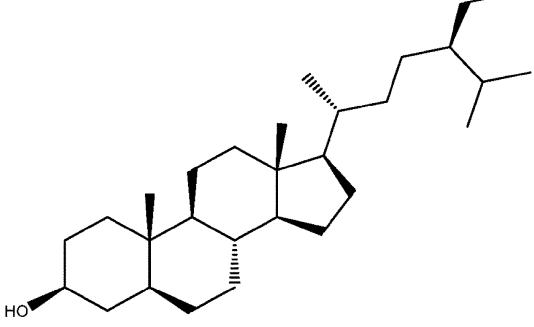
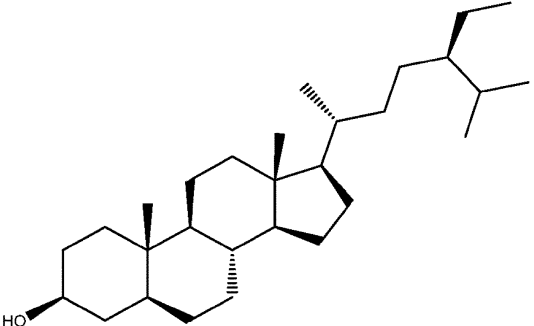
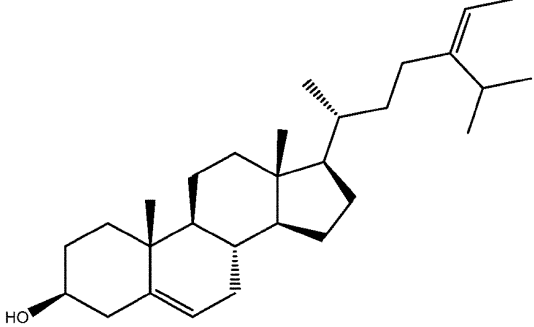
10

20

30

40

50

番号	脂質構造
2	
3	
4	
5	

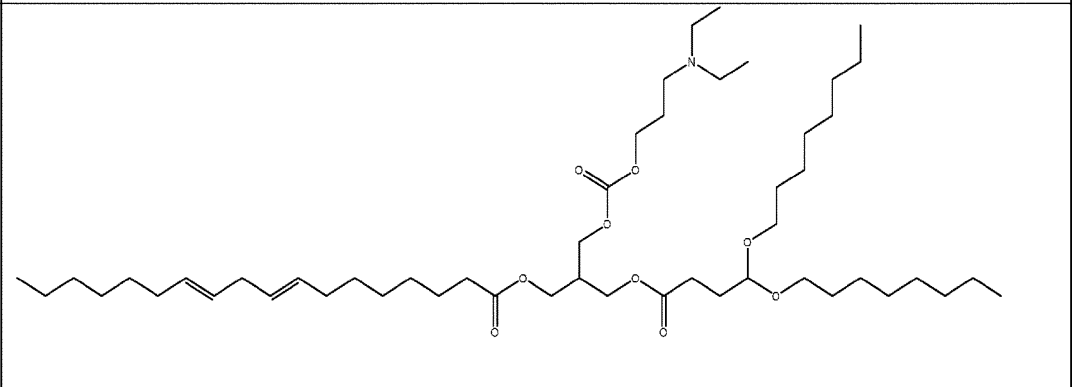
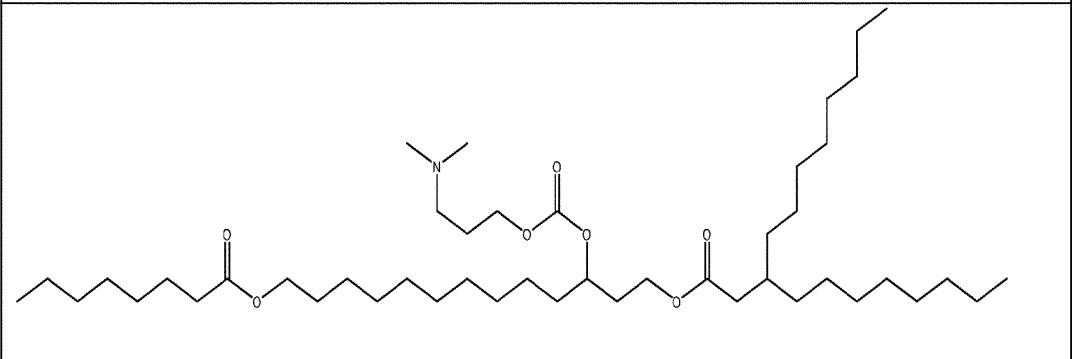
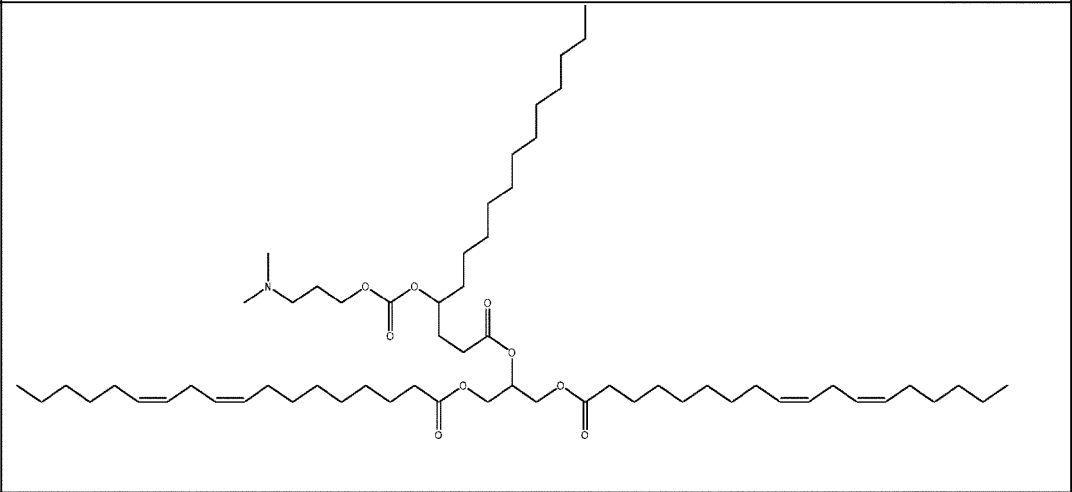
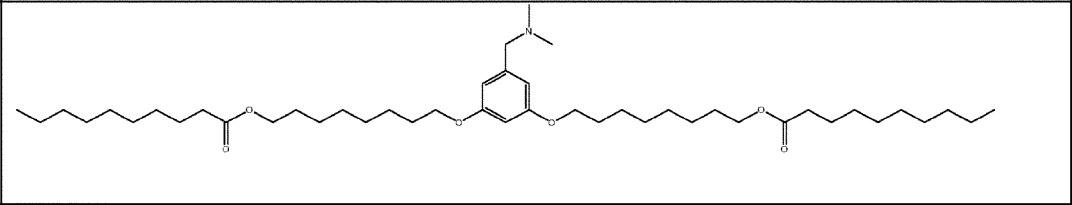
10

20

30

40

50

番号	脂質構造
6	
7	
8	
9	

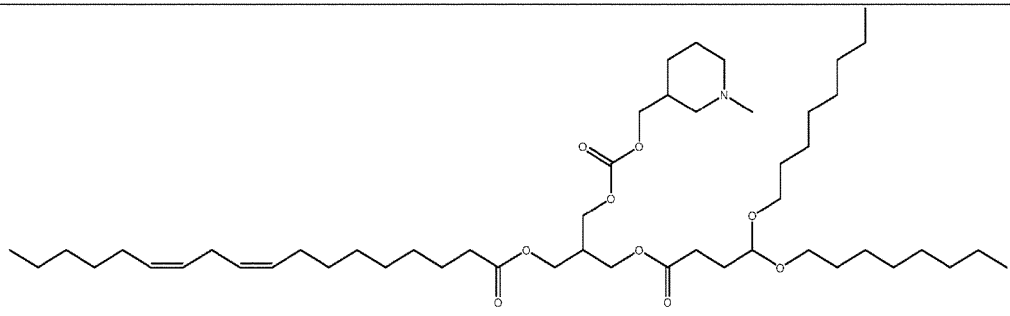
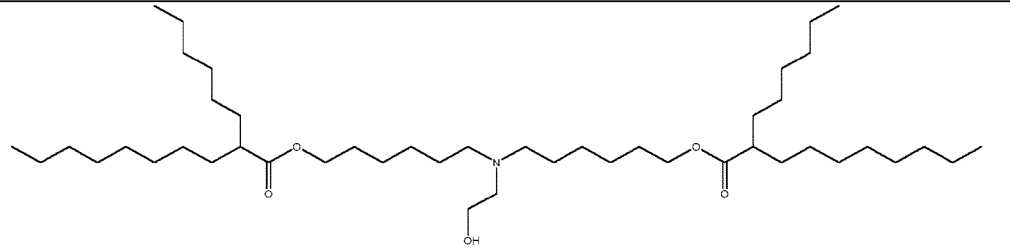
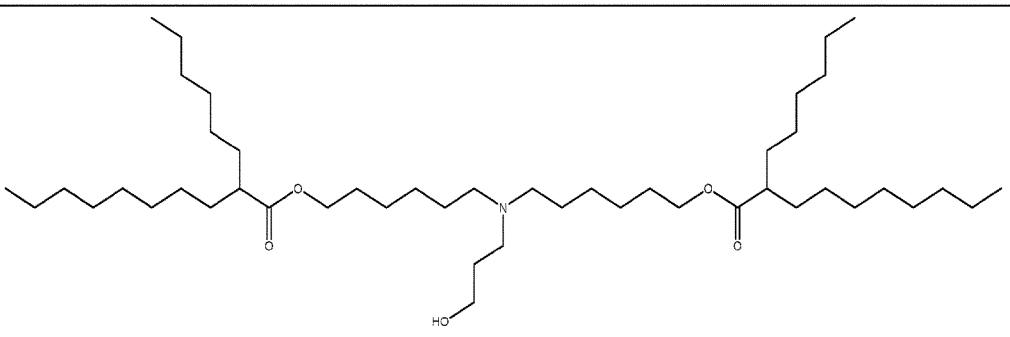
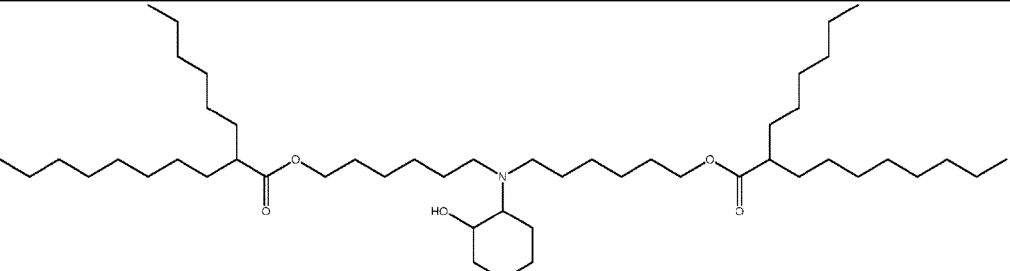
10

20

30

40

50

番号	脂質構造
10	
11	
12	
13	

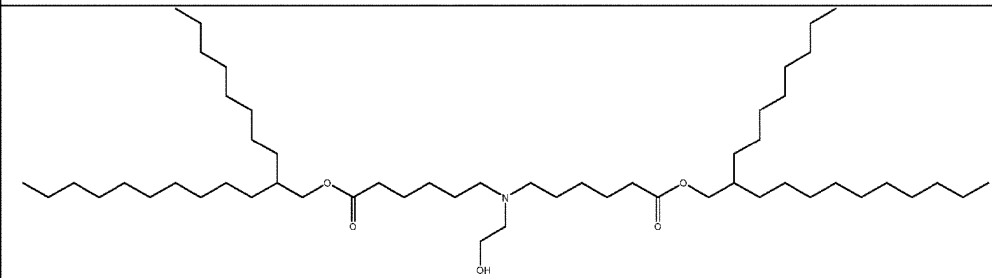
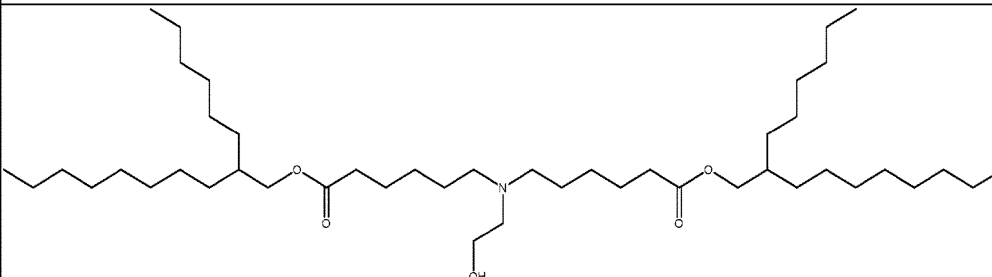
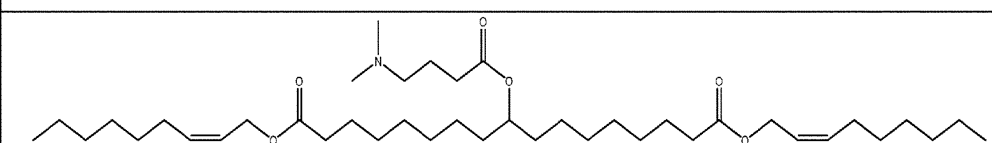
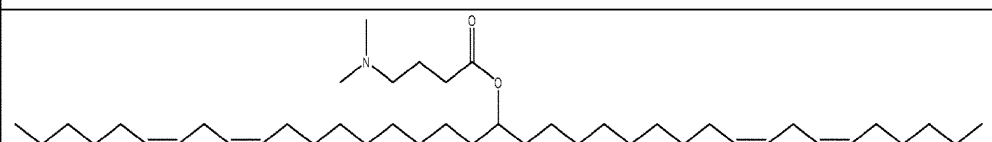
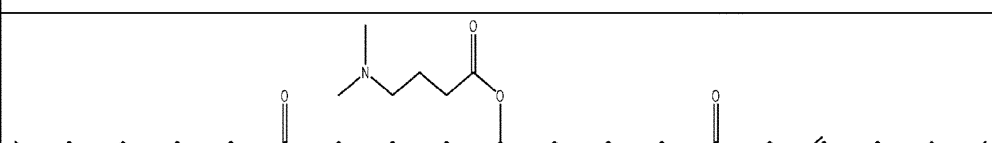
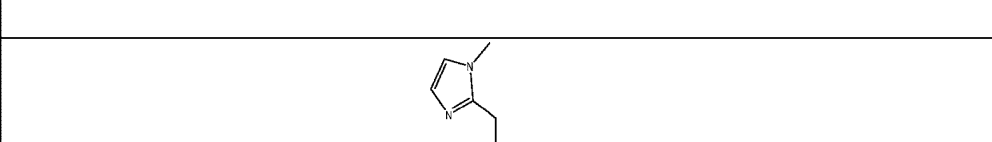
10

20

30

40

50

番号	脂質構造
14	
15	
16	
17	
18	
19	

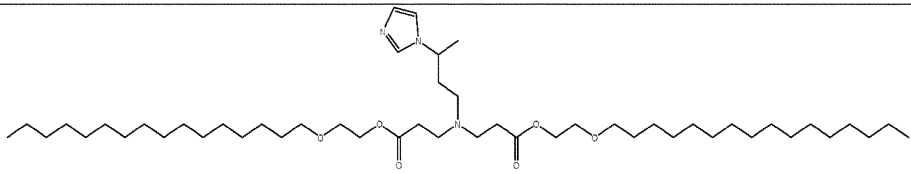
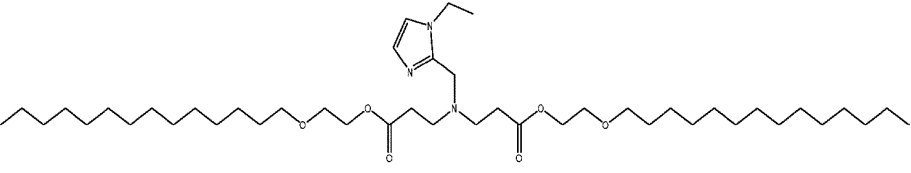
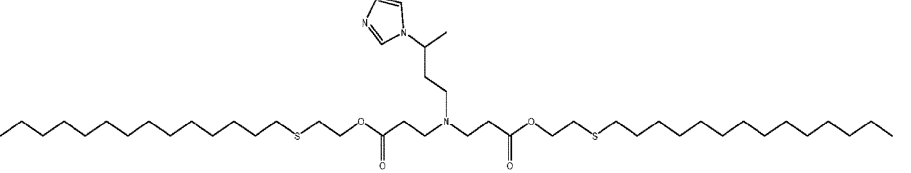
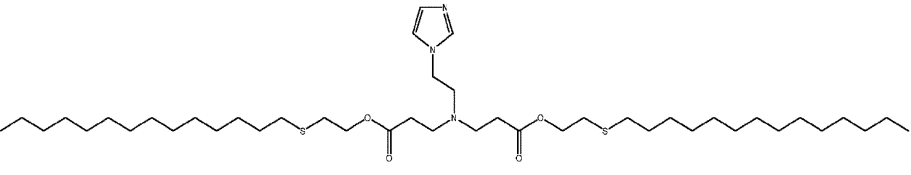
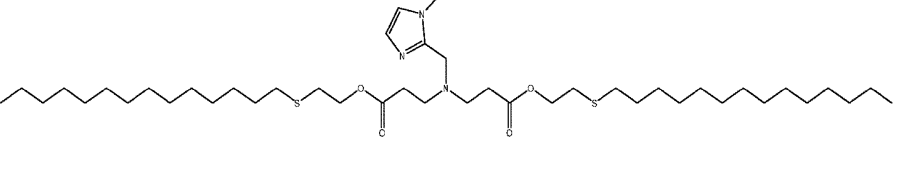
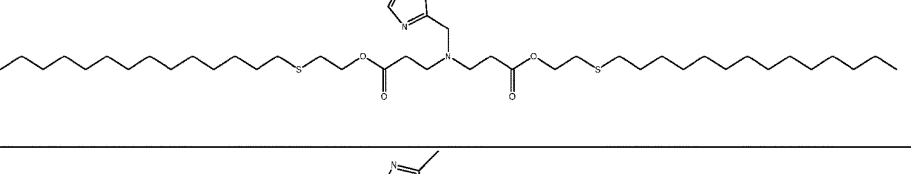
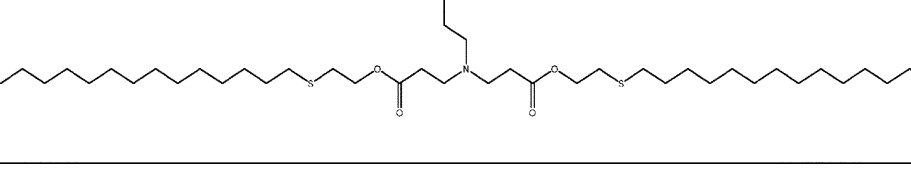
10

20

30

40

50

番号	脂質構造
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	

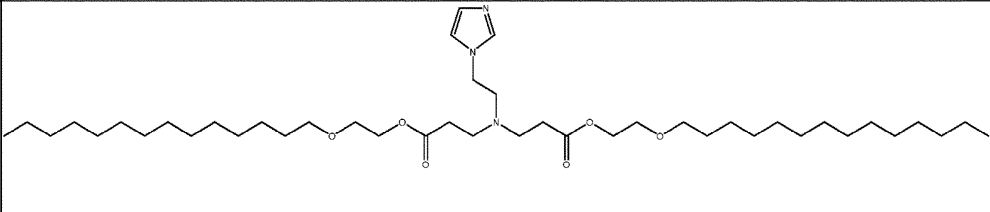
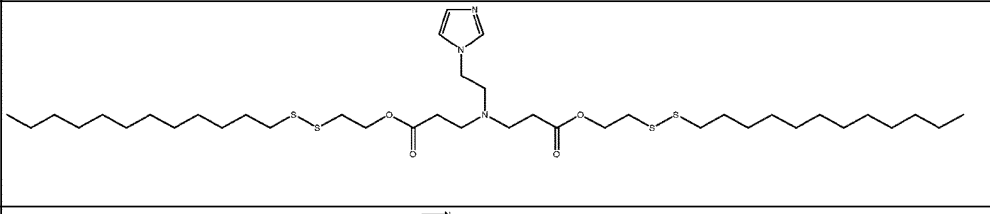
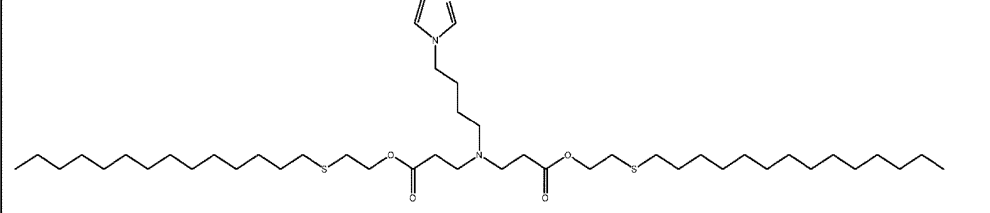
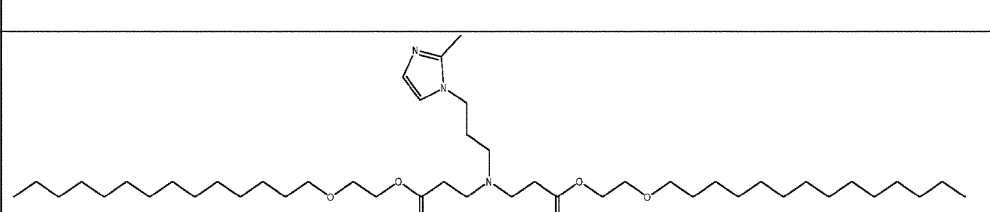
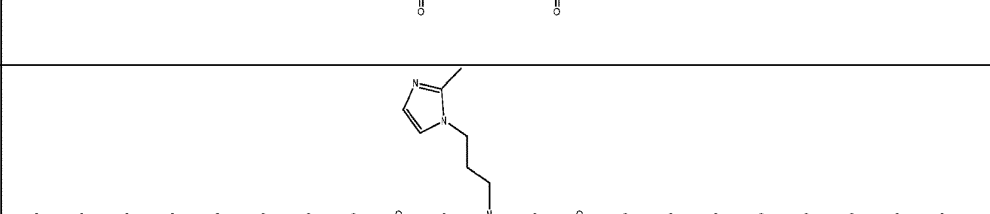
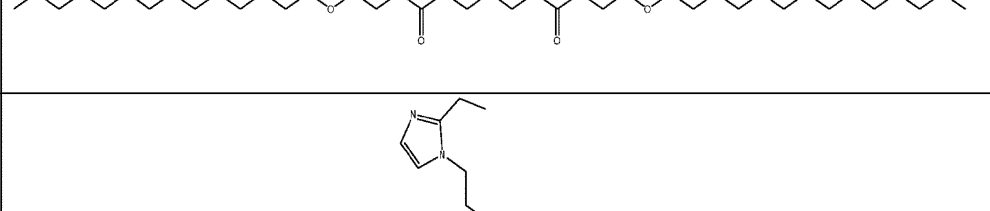
10

20

30

40

50

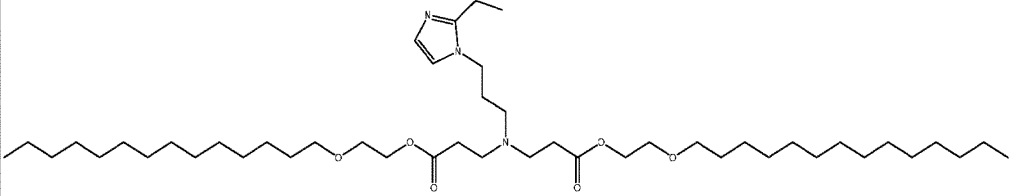
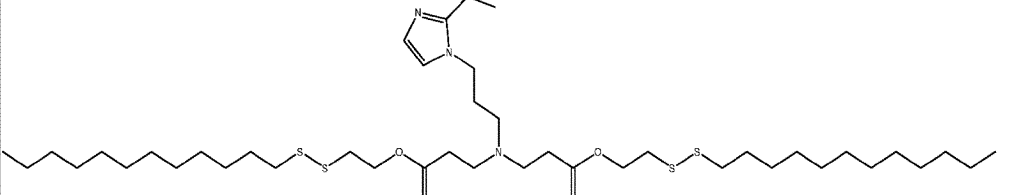
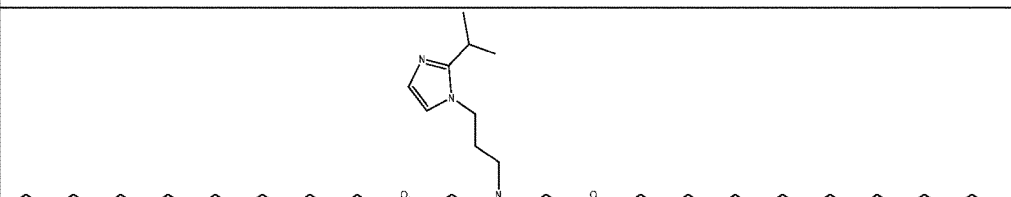
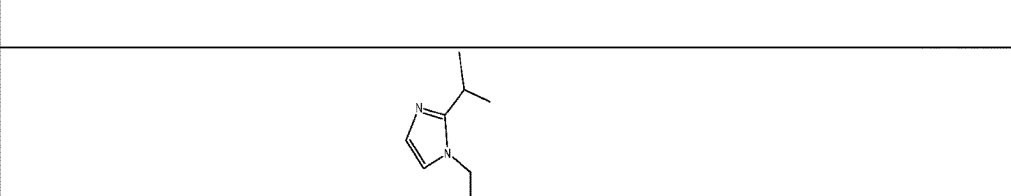
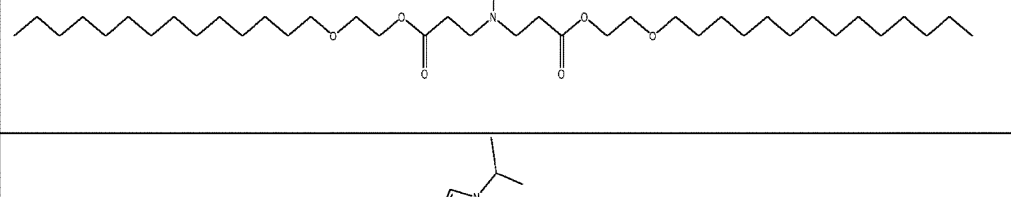
番号	脂質構造
27	
28	
29	
30	
31	
32	

10

20

30

40

番号	脂質構造
33	
34	
35	
36	
37	

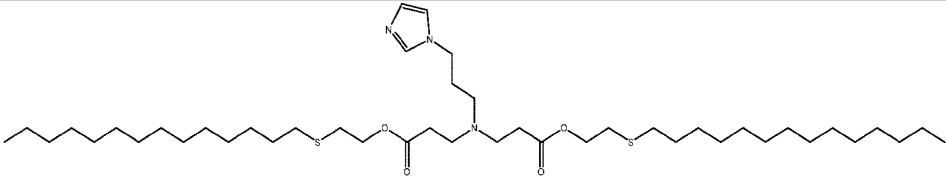
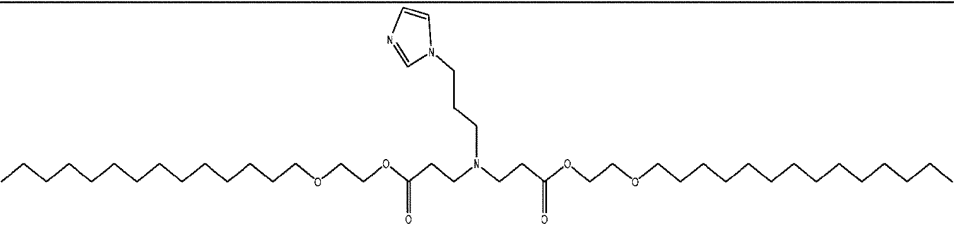
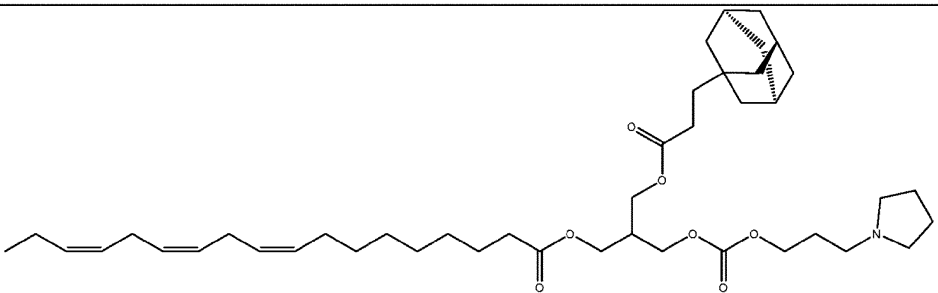
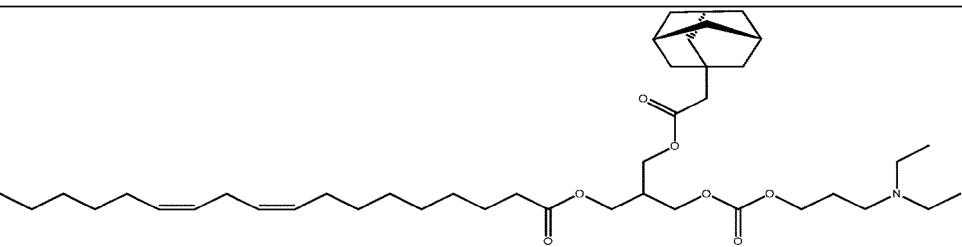
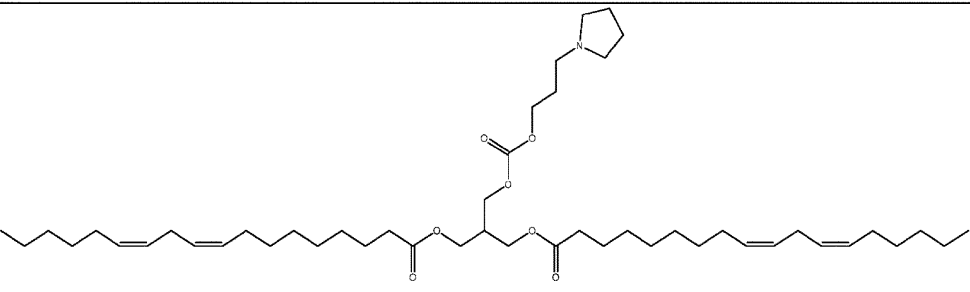
10

20

30

40

50

番号	脂質構造
38	
39	
40	
41	
42	

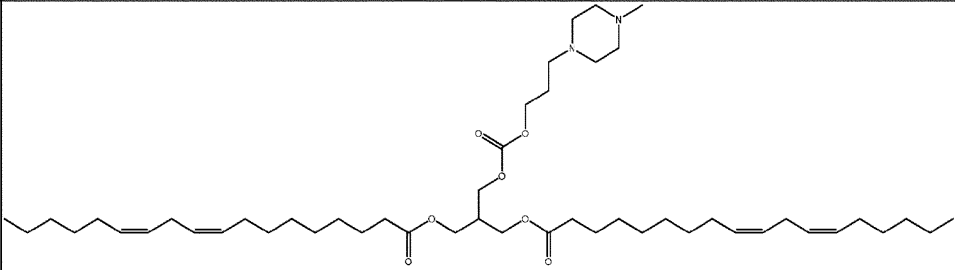
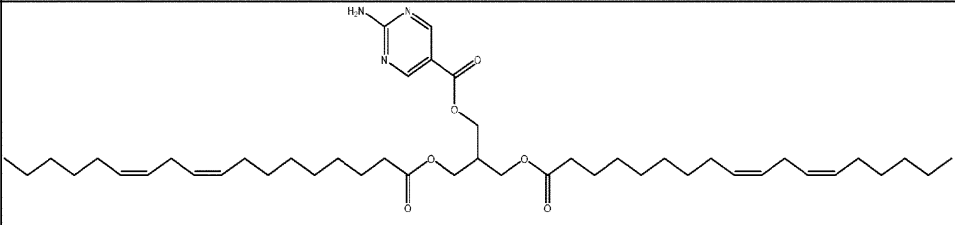
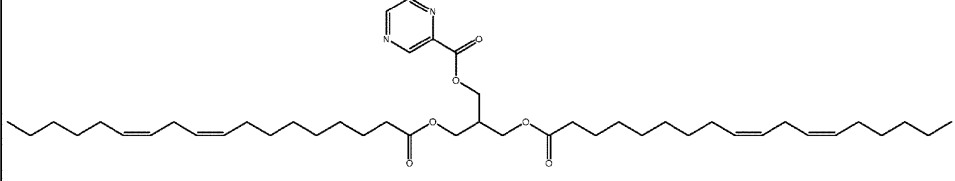
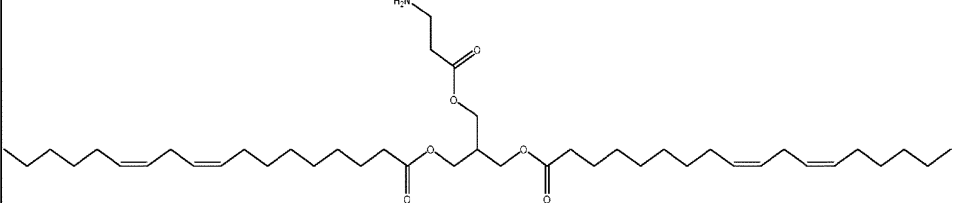
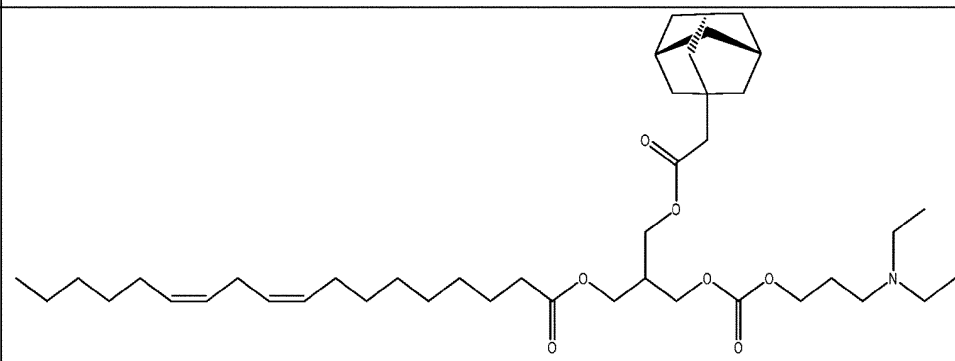
10

20

30

40

50

番号	脂質構造
43	
44	
45	
46	
47	

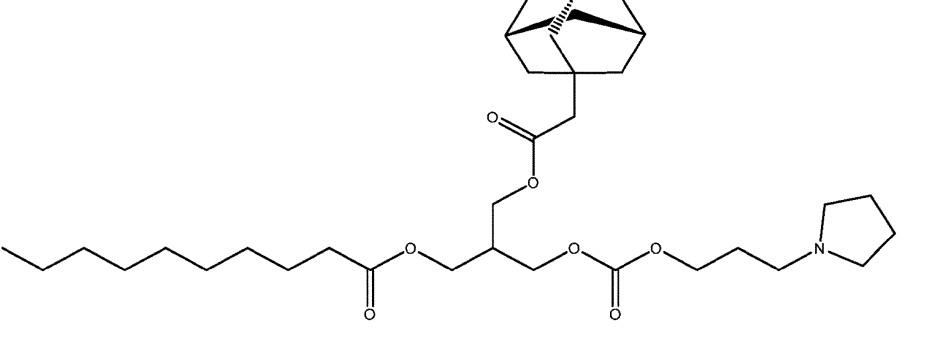
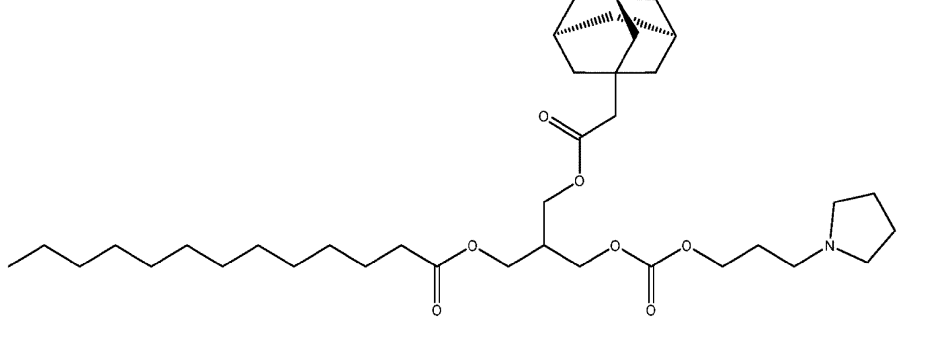
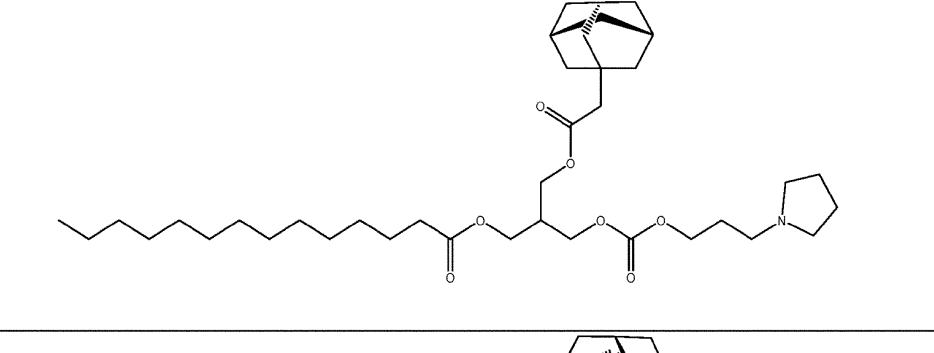
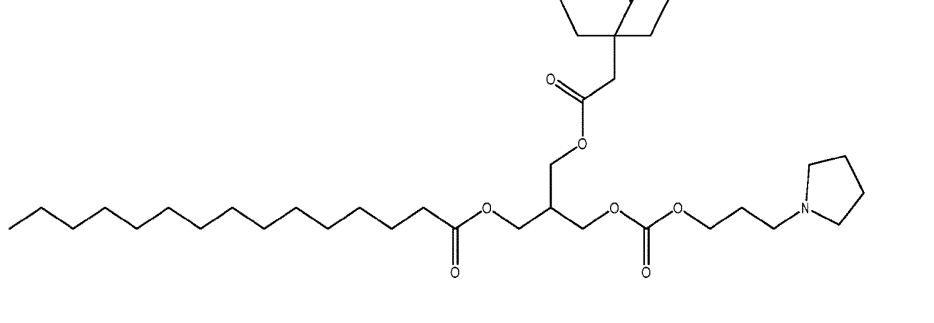
10

20

30

40

50

番号	脂質構造
48	
49	
50	
51	

10

20

30

40

50

番号	脂質構造
52	Chemical structure 52: A long-chain fatty acid derivative. The structure features a long hydrocarbon chain with a double bond. The chain is terminated by a complex ester group. This group includes a cyclohexyl ring attached to a carbonyl group, which is linked via an ester bond to a central carbon atom. This central carbon is also part of another ester linkage to a pyrrolidine ring. The overall structure is a complex lipid derivative.
53	Chemical structure 53: A long-chain fatty acid derivative. The structure features a long hydrocarbon chain with a double bond. The chain is terminated by a complex ester group. This group includes a quaternary ammonium group (N⁺) attached to a carbonyl group, which is linked via an ester bond to a central carbon atom. This central carbon is also part of another ester linkage to a long-chain fatty acid derivative. The overall structure is a complex lipid derivative.
54	Chemical structure 54: A long-chain fatty acid derivative. The structure features a long hydrocarbon chain with a double bond. The chain is terminated by a complex ester group. This group includes a quaternary ammonium group (N⁺) attached to a carbonyl group, which is linked via an ester bond to a central carbon atom. This central carbon is also part of another ester linkage to a long-chain fatty acid derivative. The overall structure is a complex lipid derivative.
55	Chemical structure 55: A long-chain fatty acid derivative. The structure features a long hydrocarbon chain with a double bond. The chain is terminated by a complex ester group. This group includes a quaternary ammonium group (N⁺) attached to a carbonyl group, which is linked via an ester bond to a central carbon atom. This central carbon is also part of another ester linkage to a long-chain fatty acid derivative. The overall structure is a complex lipid derivative.
56	Chemical structure 56: A long-chain fatty acid derivative. The structure features a long hydrocarbon chain with a double bond. The chain is terminated by a complex ester group. This group includes a quaternary ammonium group (N⁺) attached to a carbonyl group, which is linked via an ester bond to a central carbon atom. This central carbon is also part of another ester linkage to a long-chain fatty acid derivative. The overall structure is a complex lipid derivative.
57	Chemical structure 57: A long-chain fatty acid derivative. The structure features a long hydrocarbon chain with a double bond. The chain is terminated by a complex ester group. This group includes a quaternary ammonium group (N⁺) attached to a carbonyl group, which is linked via an ester bond to a central carbon atom. This central carbon is also part of another ester linkage to a long-chain fatty acid derivative. The overall structure is a complex lipid derivative.
58	Chemical structure 58: A long-chain fatty acid derivative. The structure features a long hydrocarbon chain with a double bond. The chain is terminated by a complex ester group. This group includes a quaternary ammonium group (N⁺) attached to a carbonyl group, which is linked via an ester bond to a central carbon atom. This central carbon is also part of another ester linkage to a long-chain fatty acid derivative. The overall structure is a complex lipid derivative.

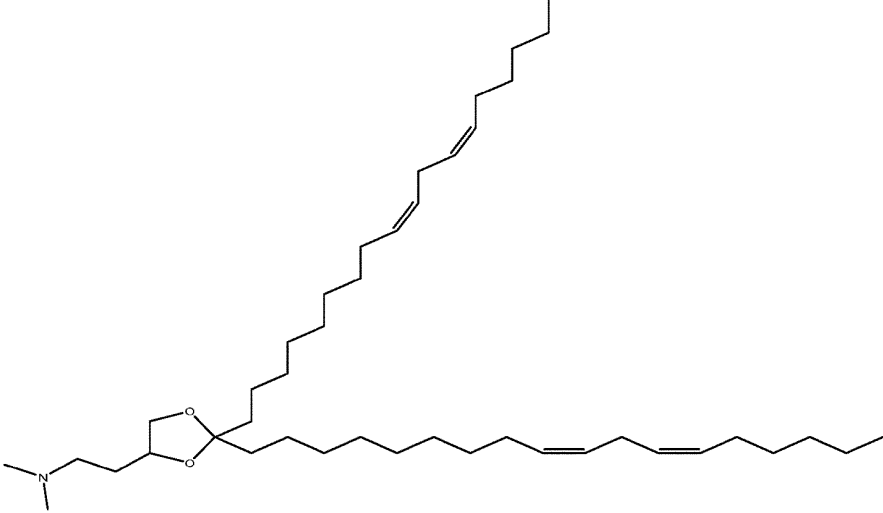
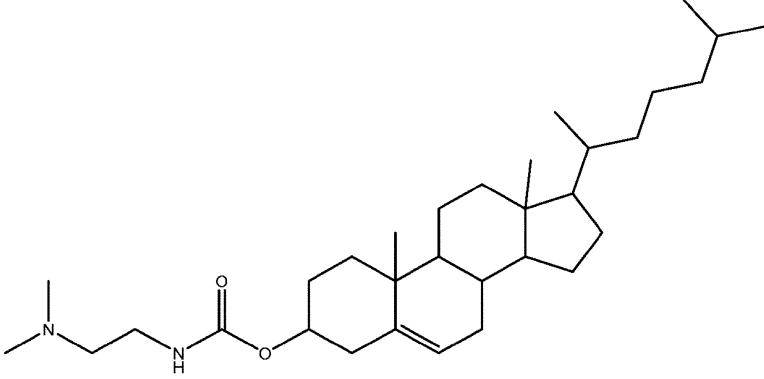
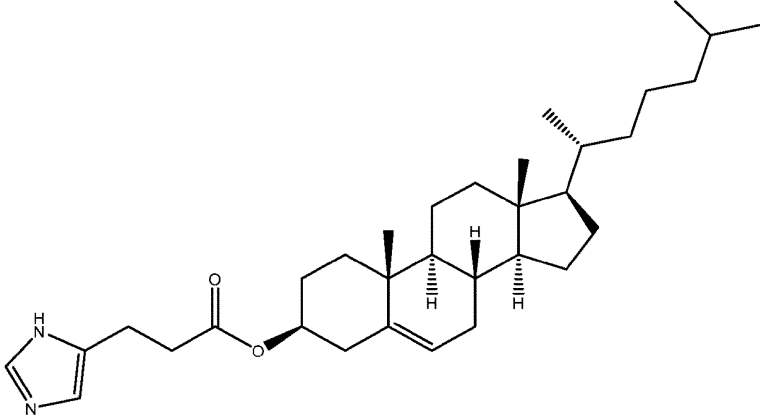
10

20

30

40

50

番号	脂質構造
59	
60	
61	

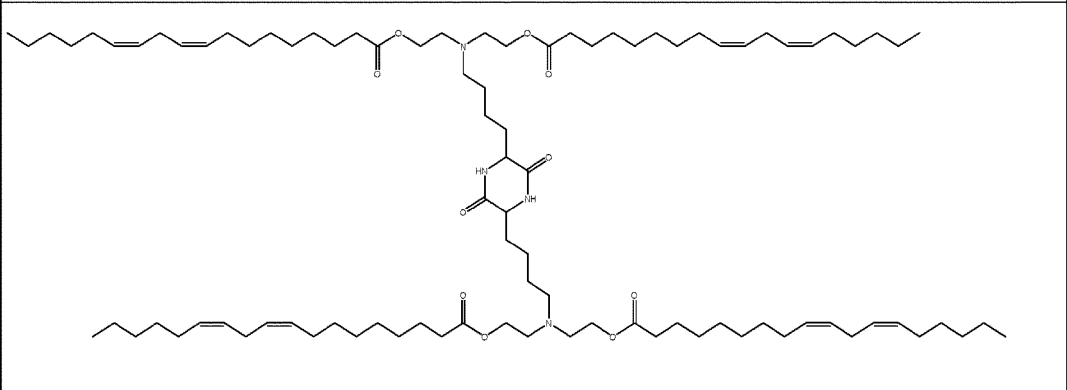
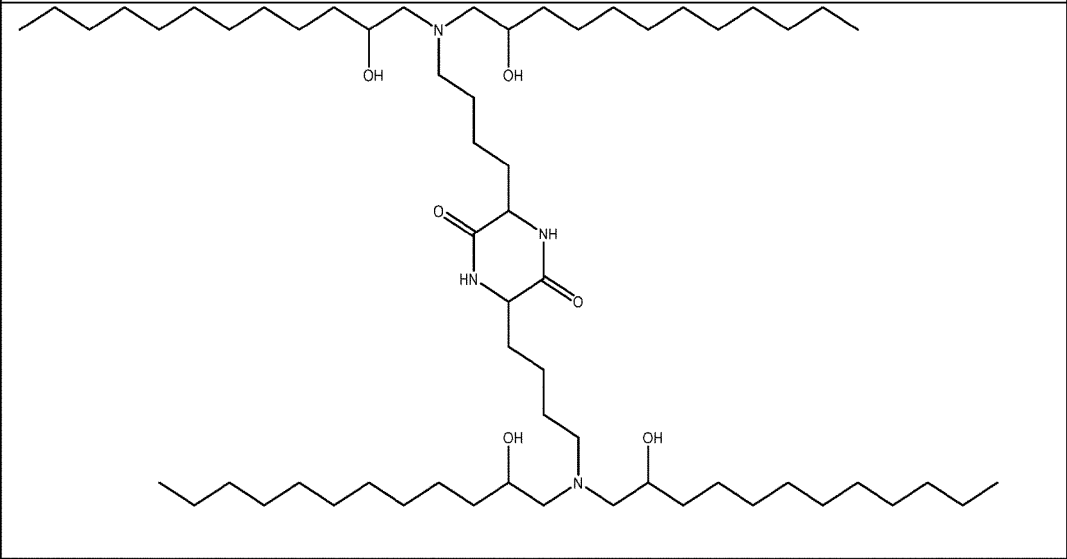
10

20

30

40

50

番号	脂質構造
62	
63	

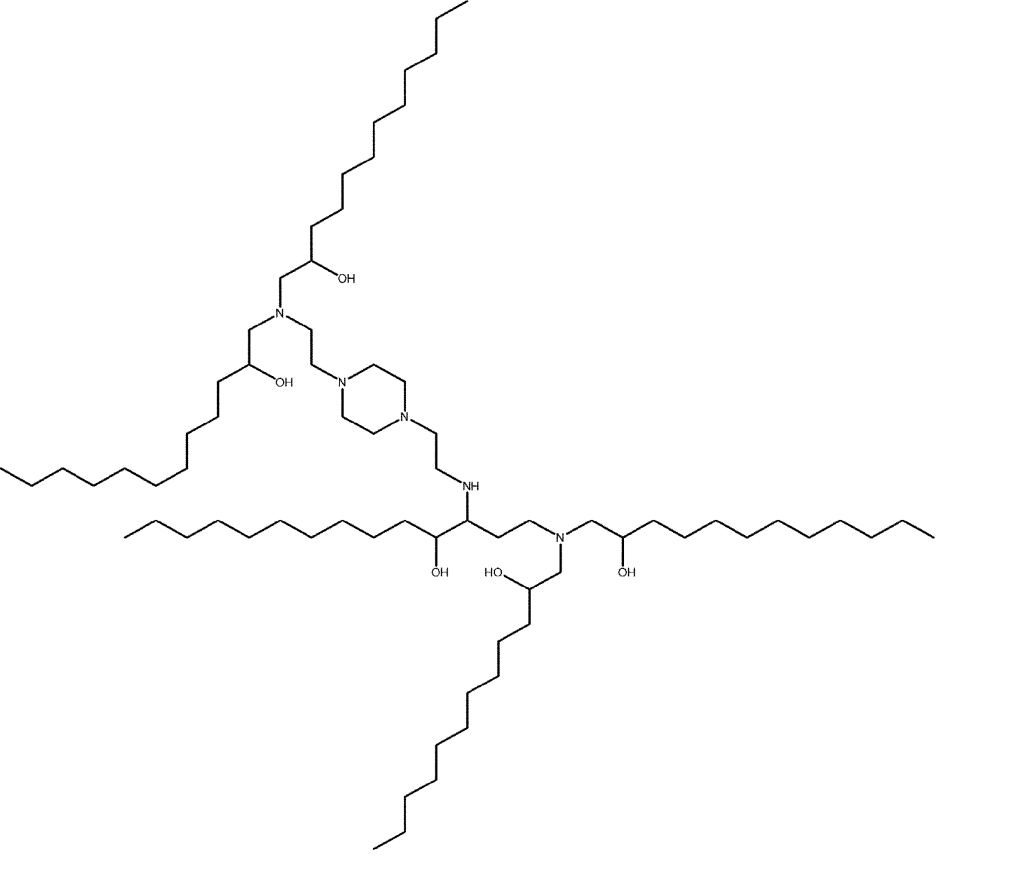
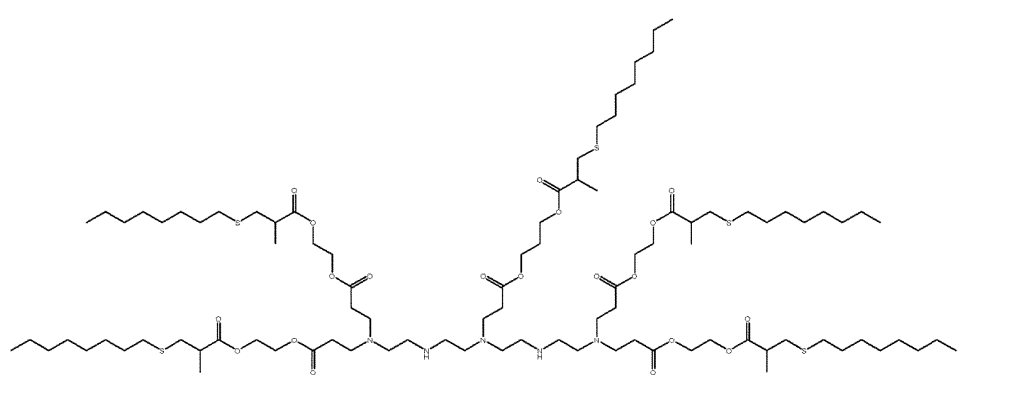
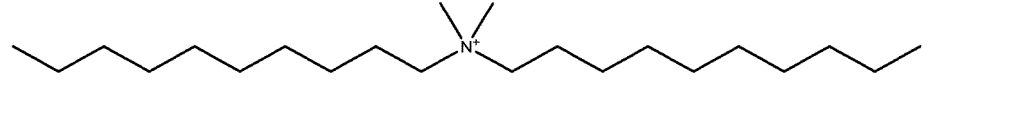
10

20

30

40

50

番号	脂質構造
64	
65	
66	

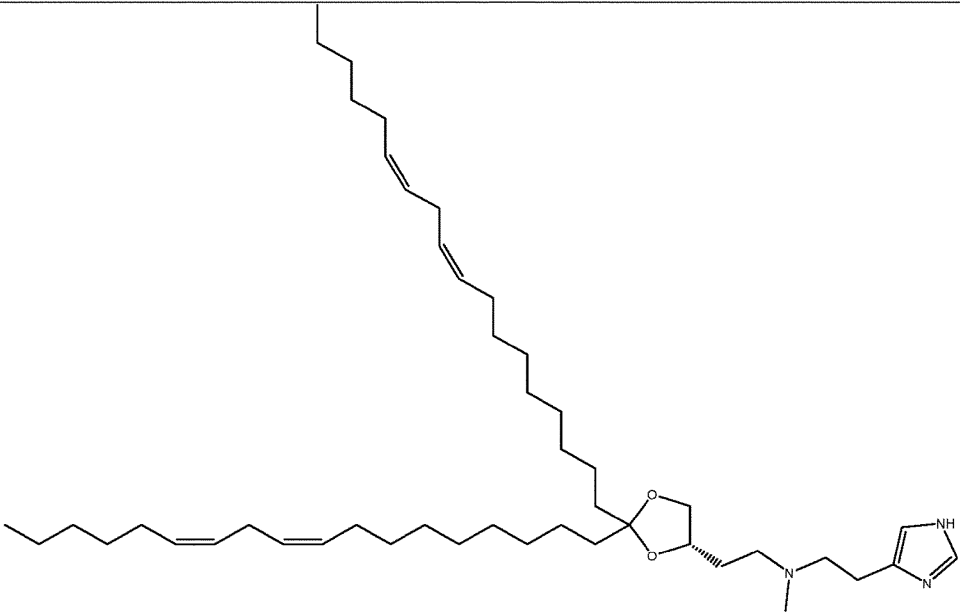
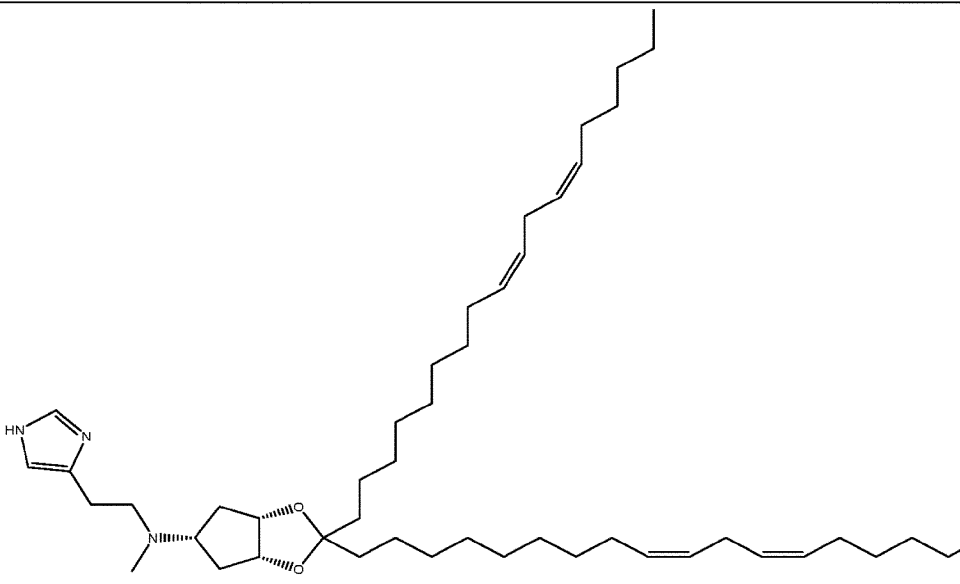
10

20

30

40

50

番号	脂質構造
67	 Chemical structure of compound 67: A long-chain fatty acid derivative. The main chain is a long alkyl chain with two double bonds. A branched side chain is attached to the main chain, consisting of a short alkyl chain, an acetal ring, and a pyrazole group.
68	 Chemical structure of compound 68: A long-chain fatty acid derivative. The main chain is a long alkyl chain with two double bonds. A branched side chain is attached to the main chain, consisting of a short alkyl chain, a cyclopentane ring, an acetal ring, and a pyrazole group.

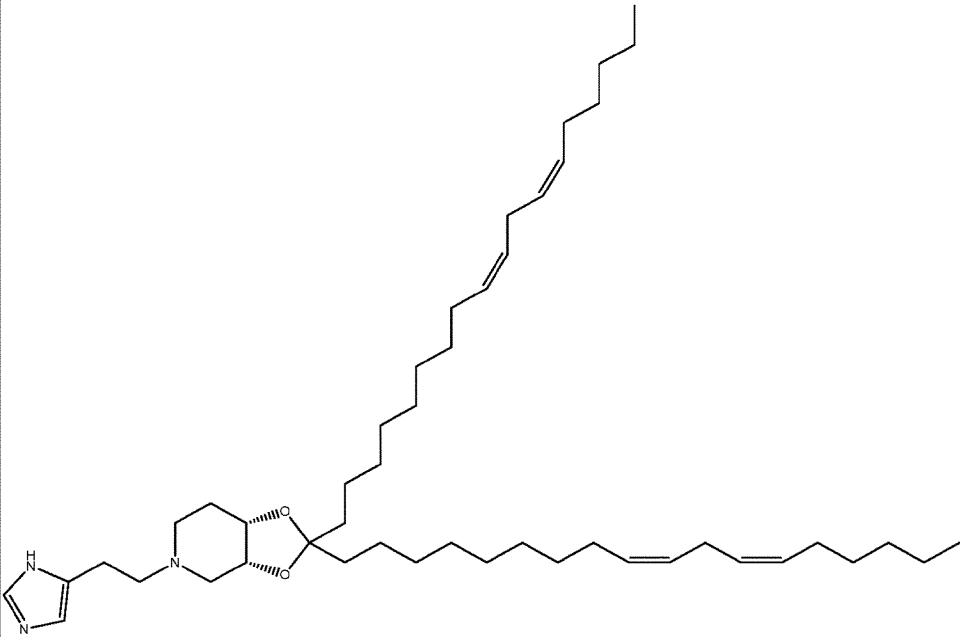
10

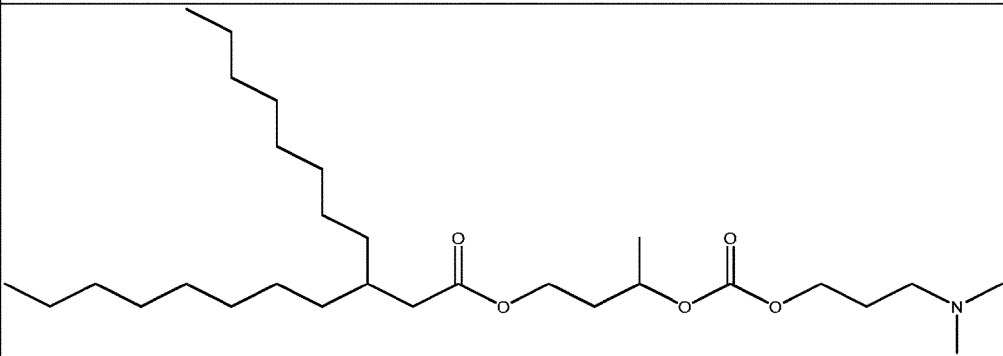
20

30

40

50

番号	脂質構造
69	
70	

番号	脂質構造
71	

【0196】

5. PEG脂質

本明細書に記載のリポソーム及び医薬組成物における、ポリエチレングリコール（PEG）修飾リン脂質及び誘導体化脂質、例えば誘導体化セラミド（PEG-CER）、例えば、N-オクタノイルスフィンゴシン-1-[スクシニル（メトキシポリエチレングリコール）-2000]（C8 PEG-2000セラミド）の、好ましくは、本明細書に開示する化合物及び脂質のうちの1つまたは複数と組み合わせた、使用及び包含が企図される。企図されるPEG修飾脂質には、C6～C20長さのアルキル鎖（複数可）を伴う脂質に共有結合的に付着した最大5 kDaの長さのポリエチレングリコール鎖が含まれるが、これに限定されない。一部の実施形態では、本発明の組成物及び方法において採用されるPEG修飾脂質は、1, 2-ジミリスチル-s n-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（2000 MW PEG）「DMG-PEG 2000」である。脂質送達ビヒクルへのPEG修飾脂質の追加は、複雑な凝集を防止し得、循環寿命を延ばし、標的組織への脂質-ポリヌクレオチド組成物の送達を増加させる手段も提供し得る（Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237）、またはそれらは、インビボで製剤から迅速に交換されるよう選択され得る（米国特許第5, 885, 613号を参照されたい）。特に有用な交換可能脂質は、より短いアシル鎖（例えば、C14またはC18）を有するPEG-セラミドである。本発明のPEG修飾リン脂質及び誘導体化脂質は、リポソーム脂質ナノ粒子に存在する総脂質の約0%～約20%、約0.5%～約20%、約1%～約15%、約4%～約10%、または約2%のモル比を構成し得る。

10

20

【0197】

ある実施形態では、PEG修飾脂質は、国際特許出願PCT/US2019/015913に記載されている。ある実施形態では、輸送ビヒクルは、1つまたは複数のPEG修飾脂質を含む。

【0198】

PEG脂質の非限定的な例としては、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジン酸、PEG-セラミドコンジュゲート（例えば、PEG-Cer C14またはPEG-Cer C20）、PEG修飾ジアルキルアミン及びPEG修飾1, 2-ジアシルオキシプロパン-3-アミンが挙げられる。かかる脂質は、PEG化脂質とも称される。例えば、PEG脂質は、PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC、またはPEG-DSPE脂質であることができる。

30

【0199】

一部の実施形態では、PEG脂質には、1, 2-ジミリスチル-s n-グリセロールメトキシポリエチレングリコール（PEG-DMG）、1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ（ポリエチレングリコール）]（PEG-DSPE）、PEG-ジステリルグリセロール（PEG-DSG）、PEG-ジパルメトレイル、PEG-ジオレイル、PEG-ジステアリル、PEG-ジアシルグリカミド（PEG-DAG）、PEG-ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（PEG-DPPE）、またはPEG-1, 2-ジミリスチルオクスプロピル-3-アミン（PEG-c-DMA）が含まれるが、これに限定されない。

40

【0200】

一実施形態では、PEG脂質は、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG修飾ホスファチジン酸、PEG修飾セラミド、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、PEG修飾ジアルキルグリセロール、及びその混合物からなる群から選択される。

【0201】

一部の実施形態では、PEG脂質の脂質部分は、約C14～約C22、例えば約C14～約C16の長さを有するものを含む。一部の実施形態では、PEG部分、例えば、mPE

50

G-NH₂は、約1000、2000、5000、10,000、15,000、または20,000ダルトンのサイズを有する。一実施形態では、PEG脂質は、PEG 2k-DMGである。

【0202】

一実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子は、非拡散性PEGであるPEG脂質を含むことができる。非拡散性PEGの非限定的な例としては、PEG-DSG及びPEG-DSP Eが挙げられる。

【0203】

PEG脂質は、米国特許第8158601号及び国際公開番号WO/2015/130584 A2（これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているものなど、当該技術分野で公知である。

【0204】

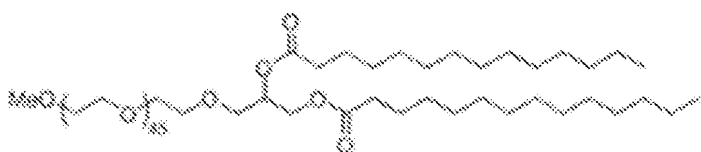
一般に、本明細書に記載のさまざまな式の他の脂質成分（例えば、PEG脂質）のいくつかは、国際特許出願番号PCT/US2016/000129（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているように合成され得る。

【0205】

脂質ナノ粒子組成物の脂質成分は、PEGまたはPEG修飾脂質などのポリエチレングリコールを含む1つまたは複数の分子を含み得る。かかる種は、代替的に、ペグ化脂質と称され得る。PEG脂質は、ポリエチレングリコールで修飾された脂質である。PEG脂質は、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG修飾ホスファチジン酸、PEG修飾セラミド、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、PEG修飾ジアルキルグリセロール、及びその混合物を含む非限定的な群から選択され得る。例えば、PEG脂質は、PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC、またはPEG-DSP E脂質であり得る。

【0206】

一部の実施形態では、PEG修飾脂質は、PEG-DMGの修飾形態である。PEG-DMGは、以下の構造：



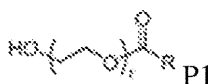
を有する。

【0207】

一実施形態では、本発明で有用なPEG脂質は、国際公開番号WO2012099755（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているPEG化脂質であることができる。本明細書に記載のこれらの例示的なPEG脂質はいずれも、PEG鎖上にヒドロキシル基を含むように修飾され得る。ある特定の実施形態では、PEG脂質は、PEG-OH脂質である。ある特定の実施形態では、PEG-OH脂質は、1つまたは複数のヒドロキシル基をPEG鎖上に含む。ある特定の実施形態では、PEG-OHまたはヒドロキシーPEG化脂質は、-OH基をPEG鎖の末端に含む。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0208】

一部の実施形態では、PEG脂質は、式(P1)：



の化合物またはその塩もしくは異性体であり、式中：

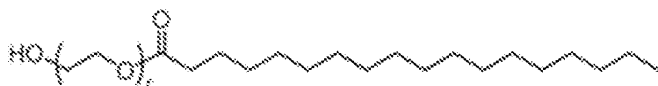
rは、1～100間の整数であり；

Rは、C₁₀-40アルキル、C₁₀-40アルケニル、またはC₁₀-40アルキニルであ

り；任意選択でRの1つまたは複数のメチレン基は、独立して、 C_{3-10} カルボシクリレン、4～10員ヘテロシクリレン、 C_{6-10} アリレン、4～10員ヘテロアリレン、 $-N(R^N)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)-$ 、 $-NR^NC(O)N(R^N)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)O-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(=NR^N)-$ 、 $-C(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(S)-$ 、 $-NR^NC(S)N(R^N)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-OS(O)-$ 、 $-S(O)O-$ 、 $-OS(O)O-$ 、 $-OS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2O-$ 、 $-OS(O)_2O-$ 、 $-N(R^N)S(O)-$ 、 $-S(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ 、 $-OS(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-OS(O)_2N(R^N)-$ 、または $-N(R^N)S(O)_2O-$ で置き換えられ；
 R^N の各例は、独立して、水素、 C_{1-6} アルキル、または窒素保護基である。

【0209】

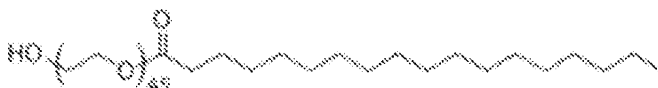
例えば、Rは、 C_{17} アルキルである。例えば、PEG脂質は、式(P1-a)：



の化合物またはその塩もしくは異性体であり、式中、rは、1～100間の整数である。

【0210】

例えば、PEG脂質は、以下の式：



の化合物である。

【0211】

6. ヘルパー脂質

一部の実施形態では、本明細書に記載の輸送ビヒクル（例えば、LNP）は、1つまたは複数の非カチオン性ヘルパー脂質を含む。一部の実施形態では、ヘルパー脂質は、リン脂質である。一部の実施形態では、ヘルパー脂質は、リン脂質代替物または代用物である。一部の実施形態では、リン脂質またはリン脂質代替物は、例えば、1つまたは複数の飽和もしくは（ポリ）不飽和リン脂質、またはリン脂質代替物、またはそれらの組み合わせであることができる。一般に、リン脂質は、リン脂質部分及び1つまたは複数の脂肪酸部分を含む。

【0212】

リン脂質部分は、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、2-リゾホスファチジルコリン、及びスフィンゴミエリンからなる非限定的な群から選択することができる。

【0213】

脂肪酸部分は、例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ-リノレン酸、エルカ酸、フィタン酸、アラキジン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、及びドコサヘキサエン酸からなる非限定的な群から選択され得る。

【0214】

リン脂質には、グリセロリン脂質、例えばホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグ

リセロール、及びホスファチジン酸が含まれるが、これに限定されない。リン脂質には、リンスフィンゴ脂質、例えばスフィンゴミエリンも含まれる。

【0215】

一部の実施形態では、ヘルパー脂質は、1,2-ジステアロイル-1,3-グリセロール-3-ホスホコリン(DSPC)類似体、DSPC代替物、オレイン酸、またはオレイン酸類似体である。

【0216】

一部の実施形態では、ヘルパー脂質は、非ホスファチジルコリン(PC)双性イオン性脂質、DSPC類似体、オレイン酸、オレイン酸類似体、またはDSPC代替物である。

【0217】

一部の実施形態では、ヘルパー脂質は、PCT/US2018/053569に記載されている。本開示の脂質組成物での使用に好適なヘルパー脂質には、例えば、さまざまな中性、非荷電または双性イオン性脂質が含まれる。かかるヘルパー脂質は、好ましくは、本明細書に開示する化合物及び脂質のうちの1つまたは複数と組み合わせて使用される。ヘルパー脂質の例としては、5-ヘプタデシルベンゼン-1,3-ジオール(レゾルシノール)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ホスホコリン(DOPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ホスファチジルコリン(PLPC)、1,2-ジステアロイルsn-グリセロール-3-ホスホコリン(DAPC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、卵ホスファチジルコリン(EPC)、ジラウリロイルホスファチジルコリン(DLPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、1-ミリストイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン(MPPC)、1-パイミトイル-2-ミリストイルホスファチジルコリン(PMPC)、1-パルミトイル-2-ステアロイルホスファチジルコリン(PSPC)、1,2-ジアラキドイルsn-グリセロール-3-ホスホコリン(DBPC)、1-ステアロイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン(SPPC)、1,2-ジエコセノイルsn-グリセロール-3-ホスホコリン(DEPC)、パイミトイオイエオイルホスファチジルコリン(POPC)、リゾホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)ジリノレオイルホスファチジルコリンジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン(DMPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン(POPE)、リゾホスファチジルエタノールアミン及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これに限定されない。一実施形態では、ヘルパー脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)またはジミリストイルホスファチジルエタノールアミン(DMPE)であり得る。別の実施形態では、ヘルパー脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)であり得る。ヘルパー脂質は、輸送ビヒクルの処理を安定化及び改善するように機能する。かかるヘルパー脂質は、好ましくは、他の賦形剤、例えば、本明細書に開示するイオン化可能脂質のうちの1つまたは複数と組み合わせて使用される。一部の実施形態では、イオン化可能脂質と組み合わせて使用される場合、ヘルパー脂質は、脂質ナノ粒子に存在する総脂質の5%~約90%、または約10%~約70%のモル比を構成し得る。

【0218】

7. 構造脂質

ある実施形態では、構造脂質は、国際特許出願PCT/US2019/015913に記載されている。

【0219】

本明細書に記載の輸送ビヒクルは、1つまたは複数の構造脂質を含む。脂質ナノ粒子への構造脂質の組み込みは、粒子中で他の脂質が凝集することを軽減する上で役立ち得る。構造脂質には、コレステロール、フェコステロール、エルゴステロール、バシカステロール(basicaesterol)、トマチジン、トマチン、ウルソール酸、アルファートコフェロール、及びその混合物が含まれ得るが、これに限定されない。ある特定の実施

10

20

30

40

50

形態では、構造脂質は、コレステロールである。ある特定の実施形態では、構造脂質は、コレステロール及びコルチコステロイド（例えば、プレドニゾロン、デキサメタゾン、プレドニゾン、及びヒドロコルチゾンなど）、またはその組み合わせを含む。

【0220】

一部の実施形態では、構造脂質は、ステロールである。ある特定の実施形態では、構造脂質は、ステロイドである。ある特定の実施形態では、構造脂質は、コレステロールである。ある特定の実施形態では、構造脂質は、コレステロールの類似体である。ある特定の実施形態では、構造脂質は、アルファートコフェロールである。

【0221】

本明細書に記載の輸送ビヒクルは、1つまたは複数の構造脂質を含む。輸送ビヒクル、例えば、脂質ナノ粒子への構造脂質の組み込みは、粒子中で他の脂質が凝集することを軽減する上で役立ち得る。ある特定の実施形態では、構造脂質は、コレステロール及びコルチコステロイド（例えば、プレドニゾロン、デキサメタゾン、プレドニゾン、及びヒドロコルチゾンなど）、またはその組み合わせを含む。

10

【0222】

一部の実施形態では、構造脂質は、ステロールである。構造脂質には、ステロール（例えば、フィトステロールまたはズステロール）が含まれ得るが、これに限定されない。

【0223】

ある特定の実施形態では、構造脂質は、ステロイドである。例えば、ステロールには、コレステロール、 β -シトステロール、フェコステロール、エルゴステロール、シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール、トマチジン、トマチン、ウルソール酸、またはアルファートコフェロールが含まれ得るが、これに限定されない。

20

【0224】

8. キメラ抗原受容体

キメラ抗原受容体（CARまたはCAR-T）は、遺伝子操作された受容体である。これらの操作された受容体は、本明細書に記載するような環状RNAを介してT細胞を含む免疫細胞に挿入され得る及び免疫細胞によって発現され得る。CARを使用すると、単一の受容体をプログラムして、両方が特定の抗原を認識し、その抗原に結合すると、免疫細胞を活性化してその抗原を持つ細胞を攻撃及び破壊することができる。これらの抗原が腫瘍細胞上に存在する場合、CARを発現する免疫細胞は、腫瘍細胞を標的とし、死滅させ得る。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドによってコードされるCARは、(i) 標的抗原に特異的に結合する抗原結合分子、(ii) ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメイン、ならびに(iii) 活性化ドメインを含む。

30

【0225】

ある特定の態様では、キメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR）複合体タンパク質をコードするタンパク質コード領域を含むベクター、前駆体RNA及び環状RNAポリヌクレオチドを本明細書に提供する。

【0226】

CARは、T細胞シグナル伝達ドメインに連結した抗原結合ドメイン（例えば、一本鎖可変フラグメント（scFv））を含有する人工的に構築されたハイブリッドタンパク質またはポリペプチドである。CARの特徴には、モノクローナル抗体の抗原結合特性を利用して、T細胞特異性及び反応性を少なくとも1つの選択された標的に（例えば、非MHC制限様式で）向け直す能力が含まれる。CARが非MHC制限抗原を認識する能力により、CARを発現するT細胞は、抗原プロセッシングとは独立して抗原を認識する能力を得るため、腫瘍エスケープの主要なメカニズムが回避される。二重特異性CARは、2つの異なる抗原に特異的である。ある実施形態では、本明細書に提供するある特定のポリヌクレオチドは、二重特異性CARをコードする。

40

【0227】

一部の実施形態では、CARは、膜貫通ドメインを含む。ある実施形態では、膜貫通ド

50

メインは、CD8膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、CARは、CD8 α (CD8アルファ) ヒンジ及び膜貫通ドメインを含む。好ましい実施形態では、CD8は、ヒトである。CARは、全CD8タンパク質よりも少なく含まれ得る。(...)ある実施形態では、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、CARは、CD28ヒンジ及び膜貫通ドメインを含む。好ましい実施形態では、CD28は、ヒトである。CARは、全CD28タンパク質よりも少なく含まれ得る。

【0228】

一部の実施形態では、本開示に従うCARの配向は、抗原結合ドメイン (scFvなど) を共刺激ドメイン及び活性化ドメインとタンデムに含む。共刺激ドメインは、細胞外部分、膜貫通部分、及び細胞内部分のうちの1つまたは複数を含み得る。他の実施形態では、複数の共刺激ドメインをタンデムで利用し得る。

10

【0229】

一部の実施形態では、CARは、CARタンパク質スペーサーを含む。CARタンパク質スペーサーは、任意の前述のドメインの間にあり得る。ある実施形態では、CARは、IgG重鎖定常ドメイン (CH2CH3) スペーサーを含む。さらなる実施形態では、CARタンパク質スペーサーは、scFv及び膜貫通ドメイン間にあることができる。好ましい実施形態では、スペーサー、例えば、CH2CH3の配列は、ヒトである。

【0230】

一部の実施形態では、CARまたはTCR複合体タンパク質は、TCR複合体タンパク質 (すなわち、TCR複合体の一部を構成するタンパク質) である。一部の実施形態では、TCR複合体タンパク質は、組換えの、天然に存在するタンパク質である。一部の実施形態では、TCR複合体タンパク質は、TCR複合体の一部を構成するタンパク質の人工バージョンである。一部の実施形態では、TCR複合体タンパク質は、TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、TCRデルタ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CDデルタ、CD3ゼータ、CD4、またはCD8である。一部の実施形態では、TCR複合体タンパク質は、人工結合ドメイン、及び/または共刺激ドメインを含む。

20

【0231】

ある特定の実施形態では、TCR複合体タンパク質は、天然のTCR V α 、V β 、C α 及び/またはC β のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または100%同一である配列を含む。一部の実施形態では、各CDRまたはTCR複合体タンパク質は、目的の標的に特異的に結合するTCRまたはそのフラグメントもしくは誘導体からゼロ変化または多くても1、2、または3つの変化を含む。

30

【0232】

抗原結合ドメイン

CARは、標的抗原と相互作用する抗原結合分子を組み込むことによって、抗原 (細胞表面抗原など) に結合するように操作され得る。一部の実施形態では、抗原結合分子は、その抗体フラグメント、例えば、1つまたは複数の一本鎖抗体フラグメント (scFv) である。scFvは、互いに連結した抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域を有する一本鎖抗体フラグメントである。米国特許第7,741,465号及び同第6,319,494号、ならびにEshhar et al., Cancer Immunol Immunother (1997) 45:131-136を参照されたい。scFvは、標的抗原と特異的に相互作用する親抗体の能力を保持する。scFvは、他のCAR構成要素とともに一本鎖の一部として発現するように操作され得るため、キメラ抗原受容体で有用である。Id. Krause et al., J. Exp. Med., Volume 188, No. 4, 1998 (619-626); Finney et al., Journal of Immunology, 1998, 161:2791-2797も参照されたい。抗原結合分子が、典型的には、目的の抗原を認識して結合することができるように、CARの細胞外部分内に含有されることが理解されるであろう。二重特異性及び多重特異性C

40

50

A Rは、本発明の範囲内で企図され、1つより多い目的の標的に対する特異性を伴う。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、標的抗原に特異的なアプタマーまたはナノボディである。

【0233】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、一本鎖を含み、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、リンカーによって接続されている。一部の実施形態では、V HはリンカーのN末端に位置し、V LはリンカーのC末端に位置する。他の実施形態では、V LはリンカーのN末端に位置し、V HはリンカーのC末端に位置する。一部の実施形態では、リンカーは、少なくとも約5、少なくとも約8、少なくとも約10、少なくとも約13、少なくとも約15、少なくとも約18、少なくとも約20、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約40、少なくとも約45、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80、少なくとも約90、または少なくとも約100アミノ酸を含む。

【0234】

一部の実施形態では、C A RまたはT C Rは、群C D 1 9、C D 1 2 3、C D 2 2、C D 3 0、C D 1 7 1、C S - 1、C型レクチン様分子-1、C D 3 3、上皮成長因子受容体変異体I I I (E G F R v I I I)、ガングリオシドG 2 (G D 2)、ガングリオシドG D 3、T N F受容体ファミリーメンバーB細胞成熟(B C M A)、T n抗原((T n A g)または(G a I N A c a - S e r / T h r))、前立腺特異的膜抗原(P S M A)、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1(R O R 1)、F m s様チロシンキナーゼ3(F L T 3)、腫瘍関連糖タンパク質72(T A G 7 2)、C D 3 8、C D 4 4 v 6、癌胎児性抗原(C E A)、上皮細胞接着分子(E P C A M)、B 7 H 3(C D 2 7 6)、K I T(C D 1 1 7)、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2、メソセリン、インターロイキン11受容体アルファ(I L - 1 1 R a)、前立腺幹細胞抗原(P S C A)、プロテアーゼセリン21、血管内皮成長因子受容体2(V E G F R 2)、ルイス(Y)抗原、C D 2 4、血小板由来成長因子受容体ベータ(P D G F R - ベータ)、ステージ特異的胚性抗原-4(S S E A - 4)、C D 2 0、葉酸受容体アルファ、H E R 2、H E R 3、ムチン1、細胞表面関連(M U C 1)、表皮成長因子受容体(E G F R)、神経細胞接着分子(N C A M)、プロスターゼ、前立腺酸性ホスファターゼ(P A P)、伸長因子2突然変異(E L F 2 M)、エフリンB 2、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ(F A P)、インスリン様成長因子1受容体(I G F - I受容体)、炭酸アンヒドラーゼI X(C A I X)、プロテアソーム(プロソーム、マクロペイン)サブユニット、ベータタイプ、9(L M P 2)、糖タンパク質100(g p 100)、ブレークポイントクラスター領域(B C R)及びアベルソンマウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ1(A b l)からなる癌遺伝子融合タンパク質(b c r - a b l)、チロシナーゼ、エフリンA型受容体2(E p h A 2)、フコシルG M 1、シアリルルイス接着分子(s L e)、ガングリオシドG M 3、トランスグルタミナーゼ5(T G S 5)、高分子量黒色腫関連抗原(H M W M A A)、o - アセチル-G D 2ガングリオシド(O A c G D 2)、葉酸受容体ベータ、腫瘍内皮マーカー1(T E M 1 / C D 2 4 8)、腫瘍内皮マーカー7関連(T E M 7 R)、クローディン6(C L D N 6)、クローディン18.2(C L D N 18.2)、甲状腺刺激ホルモン受容体(T S H R)、Gタンパク質共役型受容体クラスCグループ5、メンバーD(G P R C 5 D)、染色体Xオープンリーディングフレーム61(C X O R F 61)、C D 9 7、C D 1 7 9 a、未分化リンパ腫キナーゼ(A L K)、ポリシアル酸、胎盤特異的1(P L A C 1)、g l o b o Hグリコセラミドの六糖部分(G l o b o H)、乳腺分化抗原(N Y - B R - 1)、ウロプラキン2(U P K 2)、A型肝炎ウイルス細胞受容体1(H A V C R 1)、アドレナリン受容体ベータ3(A D R B 3)、パネキシン3(P A N X 3)、Gタンパク質共役型受容体20(G P R 20)、リンパ球抗原6複合体、遺伝子座K 9(L Y 6 K)、嗅覚受容体51E 2(O R 51E 2)、T C Rガンマ代替リーディングフレームタンパク質(T A R P)、ウィルムス腫瘍タンパク質(W T 1)、がん/精巣抗原1(N Y - E S O - 1)、がん/精巣抗原2(L A G E - 1 a)、M

AGEファミリーメンバー (MAGE-A1、MAGE-A3及びMAGE-A4を含む)、ETS転座バリエーション遺伝子6、染色体12pに位置 (ETV6-AML)、精子タンパク質17 (SPA17)、X抗原ファミリー、メンバー1A (XAGE1)、アングリオポイエチン結合細胞表面受容体2 (Tie 2)、黒色腫瘍精巣抗原-1 (MAD-CT-1)、黒色腫瘍精巣抗原-2 (MAD-CT-2)、Fos関連抗原1、腫瘍タンパク質p53 (p53)、p53突然変異体、プロスタチン、サバイビン、テロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原-1、T細胞1によって認識される黒色腫瘍抗原1、ラット肉腫 (Ras) 突然変異体、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT)、肉腫転座ブレークポイント、アポトーシスの黒色腫瘍阻害因子 (ML-IAP)、ERG (膜貫通プロテアーゼ、セリン2 (TMPRSS2) ETS融合遺伝子)、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV (NA17)、ペアボックスタンパク質Pax-3 (PAX3)、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、v-mycトリ骨髄細胞腫瘍ウイルス癌遺伝子神経芽腫由来ホモログ (MYCN)、RasホモログファミリーメンバーC (RhoC)、チロシナーゼ関連タンパク質2 (TRP-2)、チトクロームP450 1B1 (CYP1B1)、CCTC結合因子 (亜鉛フィンガータンパク質) 様、T細胞3により認識される扁平上皮細胞癌抗原 (SART3)、ペアボックスタンパク質Pax-5 (PAX5)、プロアクロシン結合タンパク質sp32 (OY-TES1)、リンパ球特異的タンパク質チロシナーゼ (LCK)、Aキナーゼ固定タンパク質4 (AKAP-4)、滑膜肉腫、Xブレークポイント2 (SSX2)、進行型糖化末端産物の受容体 (RAGE-1)、腎臓ユビキタス1 (RU1)、腎臓ユビキタス2 (RU2)、レグマイン、ヒト乳頭腫ウイルスE6 (HPV E6)、ヒト乳頭腫ウイルスE7 (HPV E7)、腸カルボキシルエステラーゼ、ヒートショックタンパク質70-2突然変異 (mut hsp70-2)、CD79a、CD79b、CD72、白血球関連免疫グロブリン様受容体1 (LAIR1)、IgA受容体のFcフラグメント (FCARまたはCD89)、白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーAメンバー2 (LILRA2)、CD300分子様ファミリーメンバーf (CD300LF)、C型レクチンドメインファミリー12メンバーA (CLEC12A)、骨髄間質細胞抗原2 (BST2)、EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2 (EMR2)、リンパ球抗原75 (LY75)、グリピカン-3 (GPC3)、Fc受容体様5 (FCRL5)、MUC16、5T4、8H9、 $\alpha v \beta \theta$ インテグリン、 $\alpha v \beta 6$ インテグリン、アルファフェトプロテイン (AFP)、B7-H6、ca-125、CA9、CD44、CD44v7/8、CD52、E-カドヘリン、EMA (上皮膜抗原)、上皮糖タンパク質-2 (EGP-2)、上皮糖タンパク質-40 (EGP-40)、Erbb4、上皮腫瘍抗原 (ETA)、葉酸結合タンパク質 (FBP)、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (KDR)、k-軽鎖、L1細胞接着分子、MUC18、NKG2D、癌胎児性抗原 (h5T4)、腫瘍/精巣抗原1B、GAGE、GAGE-1、BAGE、SCP-1、CTZ9、SAGE、CAGE、CT10、MART-1、免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1 (IGLL1)、B型肝炎表面抗原結合タンパク質 (HBsAg)、ウイルスキャプシド抗原 (VCA)、初期抗原 (EA)、EBV核抗原 (EBNA)、HHV-6 p41初期抗原、HHV-6 BU94潜伏抗原、HHV-6 B p98後期抗原、サイトメガロウイルス (CMV) 抗原、ラージT抗原、スモールT抗原、アデノウイルス抗原、呼吸器合胞体ウイルス (RSV) 抗原、血球凝集素 (HA)、ノイラミニダーゼ (NA)、パラインフルエンザ1型抗原、パラインフルエンザ2型抗原、パラインフルエンザ3型抗原、パラインフルエンザ4型抗原、ヒトメタニューモウイルス (HMPV) 抗原、C型肝炎ウイルス (HCV) コア抗原、HIV p24抗原、ヒトT細胞リンパ栄養性ウイルス (HTLV-1) 抗原、メルケル細胞ポリオーマウイルススモールT抗原、メルケル細胞ポリオーマウイルスラージT抗原、ならびにカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) 溶解性核抗原及びKSHV潜伏核抗原から選択される抗原に特異的な抗原結合ドメインを含む。

【0235】

ヒンジ/スパーサードメイン

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、本開示のCARは、ヒンジまたはスペーサードメインを含む。一部の実施形態では、ヒンジ／スペーサードメインは、短縮型ヒンジ／スペーサードメイン（THD）を含み得、THDドメインは、完全なヒンジ／スペーサードメイン（「CHD」）の短縮バージョンである。一部の実施形態では、細胞外ドメインは、Erbb2、グリコホリンA（GpA）、CD2、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、D4、CD7、CD8a、CD8 [T CD1 1a（ITGAL）、CD1 1b（ITGAM）、CD1 1c（ITGAX）、CD1 1d（ITGAD）、CD18（ITGB2）、CD19（B4）、CD27（TNFRSF7）、CD28、CD28T、CD29（ITGB1）、CD30（TNFRSF8）、CD40（TNFRSF5）、CD48（SLAMF2）、CD49a（ITGA1）、CD49d（ITGA4）、CD49f（ITGA6）、CD66a（CEACAM1）、CD66b（CEACAM8）、CD66c（CEACAM6）、CD66d（CEACAM3）、CD66e（CEACAM5）、CD69（CLEC2）、CD79A（B細胞抗原受容体複合体関連アルファ鎖）、CD79B（B細胞抗原受容体複合体関連ベータ鎖）、CD84（SLAMF5）、CD96（Tactile）、CD100（SEMA4D）、CD103（ITGAE）、CD134（OX40）、CD137（4-1BB）、CD150（SLAMF1）、CD158A（KIR2DL1）、CD158B1（KIR2DL2）、CD158B2（KIR2DL3）、CD158C（KIR3DP1）、CD158D（KIRDL4）、CD158F1（KIR2DL5A）、CD158F2（KIR2DL5B）、CD158K（KIR3DL2）、CD160（BY55）、CD162（SELP1G）、CD226（DNAM1）、CD229（SLAMF3）、CD244（SLAMF4）、CD247（CD3-ゼータ）、CD258（LIGHT）、CD268（BAFFR）、CD270（TNFSF14）、CD272（BTLA）、CD276（B7-H3）、CD279（PD-1）、CD314（NKG2D）、CD319（SLAMF7）、CD335（NK-p46）、CD336（NK-p44）、CD337（NK-p30）、CD352（SLAMF6）、CD353（SLAMF8）、CD355（CRTAM）、CD357（TNFRSF18）、誘導性T細胞共刺激因子（ICOS）、LFA-1（CD1 1a／CD18）、NKG2C、DAP-10、ICAM-1、NKP80（KLRF1）、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、LFA-1、SLAMF9、LAT、GADS（GrpL）、SLP-76（LCP2）、PAG1／CBP、CD83リガンド、Fcガンマ受容体、MHCクラス1分子、MHCクラス2分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリンタンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、活性化NK細胞受容体、トールリガンド受容体、及びそのフラグメントまたは組み合わせからであるまたはそれに由来する（例えば、その全てまたはそのフラグメントを含む）。ヒンジまたはスペーサードメインは、天然源または合成源のいずれかに由来し得る。

【0236】

一部の実施形態では、ヒンジまたはスペーサードメインは、抗原結合分子（例えば、scFv）及び膜貫通ドメイン間に配置される。この配向では、ヒンジ／スペーサードメインは、抗原結合分子及びCARが発現される細胞膜の表面間に距離をもたらす。一部の実施形態では、ヒンジまたはスペーサードメインは、免疫グロブリンからであるまたはこれに由来する。一部の実施形態では、ヒンジまたはスペーサードメインは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgE、及びIgMまたはそのフラグメントのヒンジ／スペーサー領域から選択される。一部の実施形態では、ヒンジまたはスペーサードメインは、CD8アルファのヒンジ／スペーサー領域を含む、からである、またはこれに由来する。一部の実施形態では、ヒンジまたはスペーサードメインは、CD28のヒンジ／スペーサー領域を含む、からである、またはこれに由来する。一部の実施形態では、ヒンジまたはスペーサードメインは、CD8アルファのヒンジ／スペーサー領域のフラグメントまたはCD28のヒンジ／スペーサー領域のフラグメントを含み、フラグメントは全ヒンジ／スペーサー領域よりも小さい任意のものである。一部の実施形態では、C

10

20

30

40

50

D 8 アルファヒンジ／スパーサー領域のフラグメントまたはCD 2 8 ヒンジ／スパーサー領域のフラグメントは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個のアミノ酸を、CD 8 アルファヒンジ／スパーサー領域またはCD 2 8 ヒンジ／スパーサー領域の、N末端もしくはC末端にてまたはその両方にて除外するアミノ酸配列を含む。

【0237】

膜貫通ドメイン

本開示のCARは、膜貫通ドメイン及び／または細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含み得る。膜貫通ドメインは、CARの細胞外ドメインに融合するように設計され得る。同様に、CARの細胞内ドメインに融合し得る。一部の実施形態では、CAR内のドメインの1つに天然に関連する膜貫通ドメインが使用される。一部の例では、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへのかかるドメインの結合を回避するように選択または（例えば、アミノ酸置換によって）修飾され得る。膜貫通ドメインは、天然源または合成源のいずれかに由来し得る。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来し得る。

【0238】

膜貫通領域は、受容体チロシンキナーゼ（例えば、Er b B 2）、グリコホリンA（G p A）、4-1 B B／CD 1 3 7、活性化NK細胞受容体、免疫グロブリンタンパク質、B 7-H 3、B A F F R、B F A M E（S E A M F 8）、B T E A、CD 1 0 0（S E M A 4 D）、CD 1 0 3、CD 1 6 0（B Y 5 5）、CD 1 8、CD 1 9、CD 1 9 a、C D 2、C D 2 4 7、C D 2 7、C D 2 7 6（B 7-H 3）、C D 2 8、C D 2 9、C D 3 デルタ、C D 3 イプシロン、C D 3 ガンマ、C D 3 0、C D 4、C D 4 0、C D 4 9 a、C D 4 9 D、C D 4 9 f、C D 6 9、C D 7、C D 8 4、C D 8 アルファ、C D 8 ベータ、C D 9 6（T a c t i l e）、C D 1 1 a、C D 1 1 b、C D 1 1 c、C D 1 1 d、C D S、C E A C A M 1、C R T A M、サイトカイン受容体、D A P-1 0、D N A M 1（C D 2 2 6）、F c ガンマ受容体、G A D S、G I T R、H V E M（E I G H T R）、I A 4、I C A M-1、I C A M-1、I g アルファ（C D 7 9 a）、I E-2 R ベータ、I E-2 R ガンマ、I E-7 R アルファ、誘導性T細胞共刺激因子（I C O S）、インテグリン、I T G A 4、I T G A 4、I T G A 6、I T G A D、I T G A E、I T G A E、I T G A M、I T G A X、I T G B 2、I T G B 7、I T G B 1、K I R D S 2、E A T、L F A-1、L F A-1、C D 8 3 と特異的に結合するリガンド、L I G H T、L I G H T、L T B R、L y 9（C D 2 2 9）、リンパ球機能関連抗原-1（L F A-1；C D 1-1 a／C D 1 8）、M H C クラス1分子、N K G 2 C、N K G 2 D、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6、N K p 8 0（K L R F 1）、O X-4 0、P A G／C b p、プログラム細胞死-1（P D-1）、P S G L 1、S E L P L G（C D 1 6 2）、シグナル伝達リンパ球活性化分子（S L A M タンパク質）、S L A M（S L A M F 1；C D 1 5 0；I P O-3）、S L A M F 4（C D 2 4 4；2 B 4）、S L A M F 6（N T B-A；L y 1 0 8）、S L A M F 7、S L P-7 6、T N F 受容体タンパク質、T N F R 2、T N F S F 1 4、トールリガンド受容体、T R A N C E／R A N K L、V L A 1、もしくはV L A-6、またはそのフラグメント、トランケーション、もしくは組み合わせに由来し（すなわち、含み）得る。

【0239】

一部の実施形態では、受容体チロシンキナーゼは、インスリン受容体（I n s R）、インスリン様成長因子I受容体（I G F 1 R）、インスリン受容体関連受容体（I R R）、血小板由来成長因子受容体アルファ（P D G F R a）、血小板由来成長因子受容体ベータ（P D G F R f i）、K I T 癌原遺伝子受容体チロシンキナーゼ（K i t）、コロニー刺

10

20

30

40

50

激因子1受容体 (CSFR)、fms関連チロシンキナーゼ3 (FLT3)、fms関連
 チロシンキナーゼ1 (VEGFR-1)、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (VEGFR-2)
)、fms関連チロシンキナーゼ4 (VEGFR-3)、線維芽細胞成長因子受容体1
 (FGFR1)、線維芽細胞成長因子受容体2 (FGFR2)、線維芽細胞成長因子受容体
 3 (FGFR3)、線維芽細胞成長因子受容体4 (FGFR4)、タンパク質チロシンキ
 ナーゼ7 (CKK4)、神経栄養受容体チロシンキナーゼ1 (trkA)、神経栄養受容
 体チロシンキナーゼ2 (trkB)、神経栄養受容体チロシンキナーゼ3 (trkC)、
 受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1 (ROR1)、受容体チロシンキナーゼ様
 オーファン受容体2 (ROR2)、筋肉関連受容体チロシンキナーゼ (MuSK)、ME
 T癌原遺伝子、受容体チロシンキナーゼ (MET)、マクロファージ刺激1受容体 (Ro
 n)、AXL受容体チロシンキナーゼ (Axl)、TYR03タンパク質チロシンキナー
 ゼ (Tyro3)、MER癌原遺伝子、チロシンキナーゼ (Mer)、免疫グロブリン様
 及びEGF様ドメイン1を伴うチロシンキナーゼ (TIE1)、TEK受容体チロシンキ
 ナーゼ (TIE2)、EPH受容体A1 (EphA1)、EPH受容体A2 (EphA2)
)、(EPH受容体A3) EphA3、EPH受容体A4 (EphA4)、EPH受容体
 A5 (EphA5)、EPH受容体A6 (EphA6)、EPH受容体A7 (EphA7)
)、EPH受容体A8 (EphA8)、EPH受容体A10 (EphA10)、EPH受
 容体B1 (EphB1)、EPH受容体B2 (EphB2)、EPH受容体B3 (Eph
 B3)、EPH受容体B4 (EphB4)、EPH受容体B6 (EphB6)、retプ
 ロト腫瘍遺伝子 (Ret)、受容体様チロシンキナーゼ (RYK)、ディスコイジンドメ
 イン受容体チロシンキナーゼ1 (DDR1)、ディスコイジンドメイン受容体チロシンキ
 ナーゼ2 (DDR2)、c-ros癌遺伝子1、受容体チロシンキナーゼ (ROS)、ア
 ポトーシス関連チロシンキナーゼ (Lmr1)、レムールチロシンキナーゼ2 (Lmr2)
)、レムールチロシンキナーゼ3 (Lmr3)、白血球受容体チロシンキナーゼ (LTK)
)、ALK受容体チロシンキナーゼ (ALK)、またはセリン／トレオニン／チロシンキ
 ナーゼ1 (STYK1) に由来し (例えば、含み) 得る。

【0240】

共刺激ドメイン

ある特定の実施形態では、CARは、共刺激ドメインを含む。一部の実施形態では、共
 刺激ドメインには、4-1BB (CD137)、CD28、もしくはその両方、及び／ま
 たは細胞内T細胞シグナル伝達ドメインが含まれる。好ましい実施形態では、共刺激ドメ
 インは、ヒトCD28、ヒト4-1BB、またはその両方であり、細胞内T細胞シグナル
 伝達ドメインは、ヒトCD3ゼータ (ζ) である。4-1BB、CD28、CD3ゼータ
 、またはこれらのいずれかはそれぞれ、全4-1BB、CD28、またはCD3ゼータよ
 りも少なく含まれ得る。キメラ抗原受容体は、それらの効力を増加させるために共刺激 (シ
 グナル伝達) ドメインを組み込み得る。米国特許第7,741,465号、及び同第6
 ,319,494号、ならびにKrause et al. and Finney et
 al. (上述)、Song et al., Blood 119:696-706 (2012); Kalos et al., Sci Transl. Med. 3:95 (2011)
 ; Porter et al., N. Engl. J. Med. 365:725-33 (2011)、及びGross et al., Amur. Rev. Pharmacol. Tox
 icol. 56:59-83 (2016) を参照されたい。

【0241】

一部の実施形態では、共刺激ドメインは、配列番号318または320のアミノ酸配列
 を含む。

【0242】

細胞内シグナル伝達ドメイン

本明細書に開示する操作されたT細胞の細胞内 (シグナル伝達) ドメインは、活性化ド
 メインへのシグナル伝達を提供し得、これは次に免疫細胞の正常なエフェクター機能の少
 なくとも1つを活性化する。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性または

ヘルパー活性、例えばサイトカインの分泌であり得る。

【0243】

一部の実施形態では、好適な細胞内シグナル伝達ドメインには、4-1BB/CD137、活性化NK細胞受容体、免疫グロブリンタンパク質、B7-H3、BAFFR、BLAME (SLAMF8)、BTLA、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD19a、CD2、CD247、CD27、CD276 (B7-H3)、CD28、CD29、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD30、CD4、CD40、CD49a、CD49D、CD49f、CD69、CD7、CD84、CD8アルファ、CD8ベータ、CD96 (Tactile)、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDS、CEACAM1、CRTAM、サイトカイン受容体、DAP-10、DNAM1 (CD226)、Fcガンマ受容体、GADS、GITR、HVEM (LIGHTR)、IA4、ICAM-1、ICAM-1、Igアルファ (CD79a)、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、誘導性T細胞共刺激因子 (ICOS)、インテグリン、ITGA4、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB2、ITGB7、ITGB1、KIRDS2、LAT、LFA-1、LFA-1、CD83と特異的に結合するリガンド、LIGHT、LIGHT、LTBR、Ly9 (CD229)、Ly108)、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1; CD11a/CD18)、MHCクラス1分子、NKG2C、NKG2D、Nkp30、Nkp44、Nkp46、Nkp80 (KLRF1)、OX-40、PAG/Cbp、プログラム細胞死-1 (PD-1)、PSGL1、SELP (CD162)、シグナル伝達リンパ球活性化分子 (SLAMタンパク質)、SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3)、SLAMF4 (CD244; 2B4)、SLAMF6 (NTB-A、SLAMF7、SLP-76、TNF受容体タンパク質、TNFR2、TNFSF14、トールリガンド受容体、TRANSCENDANCE/RANKL、VLA1、もしくはVLA-6、またはそのフラグメント、トランケーション、もしくは組み合わせが含まれる (include) (例えば、含まれる (comprise)) が、これに限定されない。

【0244】

CD3は、ネイティブT細胞上のT細胞受容体のエレメントであり、CARにおいて重要な細胞内活性化エレメントであることが示されている。一部の実施形態では、CD3は、CD3ゼータである。一部の実施形態では、活性化ドメインは、配列番号319のポリペプチド配列に対して、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0245】

9. ポリヌクレオチドの産生

本明細書に提供するベクターは、分子生物学の標準的な技術を使用して作製することができる。例えば、本明細書に提供するベクターのさまざまなエレメントは、組換え法を使用して、例えば細胞からcDNA及びゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、またはポリヌクレオチドを含むことが知られているベクターからポリヌクレオチドを誘導することによって得ることができる。

【0246】

本明細書に提供するベクターのさまざまなエレメントはまた、既知の配列に基づいて、クローン化されるのではなく、合成的に生成することもできる。完全な配列は、標準的な方法によって調製された重複するオリゴヌクレオチドから組み立て、完全な配列へと組み立てることができる。例えば、Edge, Nature (1981) 292: 756; Nambair et al., Science (1984) 223: 1299; 及び Jay et al., J. Biol. Chem. (1984) 259: 6311を参照されたい。

【0247】

ゆえに、特定のヌクレオチド配列は、所望の配列を抱えるベクターから取得する、または完全に、もしくは部分的に、適切な場合には部位特異的突然変異誘発及びポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術などの当該技術分野で公知のさまざまなオリゴヌクレオチド合成技術を使用して合成することができる。所望のベクターエレメントをコードするヌクレオチド配列を取得する1つの方法は、従来の自動ポリヌクレオチドシンセサイザーで産生された重複する合成オリゴヌクレオチドの相補的セットをアニーリングし、続いて適切なDNAリガーゼでライゲーションし、PCRを介してライゲーションされたヌクレオチド配列を増幅することによる。例えば、Jayaraman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:4084-4088を参照されたい。加えて、オリゴヌクレオチド特異的合成（Jones et al., Nature (1986) 54:75-82）、既存のヌクレオチド領域のオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発（Riechmann et al., Nature (1988) 332:323-327及びVerhoeyen et al., Science (1988) 239:1534-1536）、及びT4 DNAポリメラーゼを使用するギャップを伴うオリゴヌクレオチドの酵素的充填（Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:10029-10033）を使用することができる。

【0248】

本明細書に提供する前駆体RNAは、本明細書に提供するベクターを、ベクターによってコードされる前駆体RNAの転写を許容する条件下で、インキュベートすることによって生成することができる。例えば、一部の実施形態では、前駆体RNAは、その5'二重鎖形成領域及び／または発現配列の上流にRNAポリメラーゼプロモーターを含む本明細書に提供するベクターを、適合性RNAポリメラーゼ酵素とインビトロ転写を許容する条件下でインキュベートすることによって合成される。一部の実施形態では、ベクターは、バクテリオファージRNAポリメラーゼによって細胞の内側で、または宿主RNAポリメラーゼIIによって細胞の核内でインキュベートされる。

【0249】

ある特定の実施形態では、テンプレートとして本明細書に提供されるベクター（例えば、5'相同領域の上流に配置されたRNAポリメラーゼプロモーターを有する本明細書に提供されるベクター）を使用してインビトロ転写を行うことによって前駆体RNAを生成する方法を本明細書に提供する。

【0250】

ある特定の実施形態では、結果得られた前駆体RNAを使用して、それをマグネシウムイオン及びグアノシンヌクレオチドまたはヌクレオシド存在下で、RNA環状化が生じる温度（例えば、20℃～60℃間）にてインキュベートすることによって、環状RNA（例えば、本明細書に提供する環状RNAポリヌクレオチド）を生成することができる。

【0251】

ゆえに、ある特定の実施形態では、環状RNAを作製する方法を本明細書に提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、前駆体RNAを、本明細書に提供するベクター（例えば、以下の順序で、5'相同領域、3'グループエントロンフラグメント、第1のスペーサー、内部リボソーム侵入部位（IRES）、発現配列、第2のスペーサー、5'グループエントロンフラグメント、及び3'相同領域を含むベクター）をテンプレートとして使用する転写（例えば、ランオフ転写）によって合成すること、ならびに結果得られた前駆体RNAを、二価カチオン（例えば、マグネシウムイオン）及びGTPの存在下でインキュベートして、それを環状化して環状RNAを形成することを含む。一部の実施形態では、本発明の前駆体RNAは、マグネシウムイオン及びGTPの非存在下で、及び／またはマグネシウムイオン及びGTPとのインキュベーションのステップを伴わずに、環状化することができる。一部の実施形態では、転写は、過剰のGMPの存在下で実施される。

【0252】

一部の実施形態では、環状RNAを含む組成物は、精製されている。環状RNAは、当該技術分野で一般的に使用される任意の公知の方法、例えばカラムクロマトグラフィー、

ゲル濾過クロマトグラフィー、及びサイズ排除クロマトグラフィーによって精製され得る。一部の実施形態では、精製は、以下のステップ：ホスファターゼ処理、HPLCサイズ排除精製、及びRNase R消化のうちの1つまたは複数を含む。一部の実施形態では、精製は、以下のステップを順序：RNase R消化、ホスファターゼ処理、及びHPLCサイズ排除精製で含む。一部の実施形態では、精製は、逆相HPLCを含む。一部の実施形態では、精製された組成物は、未精製RNAよりも少ない二本鎖RNA、DNAスプリント、三リン酸化RNA、ホスファターゼタンパク質、タンパク質リガーゼ、キャッピング酵素及び／またはニックの入ったRNAを含有する。一部の実施形態では、精製組成物は、未精製組成物よりも免疫原性が低い。一部の実施形態では、精製組成物に曝露された免疫細胞は、未精製組成物に曝露された免疫細胞よりも少ないIFN- β 1、RIG-1、IL-2、IL-6、IFN γ 、及び／またはTNF α を産生する。

10

【0253】

10. ナノ粒子

ある特定の態様では、本明細書に提供する環状RNAを含む医薬組成物を本明細書に提供する。ある特定の実施形態では、かかる医薬組成物は、送達を容易にするためにナノ粒子と共に製剤化される。

【0254】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、輸送ビヒクル、例えば、ナノ粒子、またはナノ粒子を含む組成物にて細胞に送達及び／または標的化され得る。一部の実施形態では、環状RNAはまた、対象に、輸送ビヒクルまたは輸送ビヒクルを含む組成物にて送達され得る。一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、ナノ粒子である。一部の実施形態では、ナノ粒子は、脂質ナノ粒子、非脂質ポリマーコアシェルナノ粒子、または生分解性ナノ粒子である。一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、1つまたは複数のカチオン性脂質、非カチオン性脂質、イオン化可能脂質、PEG修飾脂質、ポリグルタミン酸脂質、ヒアルロン酸脂質、ポリ β -アミノエステル、ポリペプチド、または正に帯電したペプチドを含む。

20

【0255】

一実施形態では、輸送ビヒクルは、標的細胞へのcircRNAの送達を最適化するように選択及び／または調製され得る。例えば、標的細胞が肝細胞である場合、輸送ビヒクルの特性（例えば、サイズ、電荷及び／またはpH）は、かかる輸送ビヒクルを標的細胞に効果的に送達し、免疫クリアランスを低下させる及び／またはその標的細胞での保持を促進するように最適化され得る。あるいは、標的細胞が中枢神経系である場合（例えば、神経変性疾患の処置のために投与されるcircRNAは、脳または脊髄組織を特異的に標的とし得る）、輸送ビヒクルの選択及び調製は、血液脳関門の透過性；血液脳関門内での保持及び／またはかかる輸送ビヒクルをかかる標的細胞に直接送達する代替手段の使用を考慮しなければならない。一実施形態では、本発明の組成物は、外因性circRNAの輸送を容易にする作用物質（例えば、血液脳関門を破壊またはその透過性を改善し、それによって外因性circRNAの標的細胞への輸送を向上する作用物質）と組み合わせられ得る。

30

【0256】

標的細胞への核酸の送達を容易にするための輸送ビヒクルの使用が、本発明によって企図されている。リポソーム（例えば、リポソーム脂質ナノ粒子）は、一般に、研究、産業、及び医学におけるさまざまな用途、特にインビボでの診断または治療化合物の輸送ビヒクルとしてのそれらの使用に有用であり（Lasica, Trends Biotechnol., 16:307-321, 1998; Drummond et al., Pharmacol. Rev., 51:691-743, 1999）、通常、1つまたは複数の二重層の膜によって外部媒体から隔離された内部水性空間を有する微視的ベシクルとして特徴付けられる。リポソームの二重層膜は、典型的には、両親媒性分子、例えば空間的に分離された親水性及び疎水性ドメインを含む合成または天然起源の脂質によって形成される（Lasica, Trends Biotechnol., 16:307-321, 1998

40

50

）。リボソームの二重層膜は、両親媒性ポリマー及び界面活性剤（例えば、ポリメロソーム、ニオソームなど）によって形成することもできる。

【0257】

本発明の文脈では、輸送ビヒクルは、典型的には、*c i r c R N A*を標的細胞に輸送するのに役立つ。本発明の目的のために、輸送ビヒクルは、所望の核酸を含有するように調製される。所望の実体（例えば、核酸）をリボソームに組み込むプロセスは、ローディングと称されることが多い（*L a s i c , e t a l . , F E B S L e t t . , 3 1 2 : 2 5 5 - 2 5 8 , 1 9 9 2*）。リボソームに組み込まれた核酸は、完全にまたは部分的に、リボソームの内部空間に、リボソームの二重層膜内に、またはリボソーム膜の外側表面に関連して位置し得る。リボソームなどの輸送ビヒクルに*c i r c R N A*を組み込む目的は、多くの場合、核酸を分解する酵素もしくは化学物質を含有し得る環境及び／または核酸の急速な排泄を引き起こすシステムもしくは受容体から核酸を保護することである。したがって、本発明のある実施形態では、選択された輸送ビヒクルは、そこに含有される*c i r c R N A*の安定性を向上することができる。リボソームは、封入された*c i r c R N A*が標的細胞に到達することを可能にすることができる及び／または封入された*c i r c R N A*が標的細胞に到達することを可能にし得る、またあるいは、投与された*c i r c R N A*の存在が有用でないまたは望ましくない可能性がある他の部位または細胞へのかかる*c i r c R N A*の送達を制限する。さらに、*c i r c R N A*を、輸送ビヒクル、例えばかかるカチオン性リボソームに組み込むことは、かかる*c i r c R N A*の標的細胞への送達を容易にもする。

【0258】

理想的には、輸送ビヒクルは、組成物が高いトランスフェクション効率及び向上した安定性を示すように、1つまたは複数の所望の*c i r c R N A*を封入するように調製される。リボソームが標的細胞への核酸の導入を容易にすることができる一方で、ポリカチオン（例えば、ポリレーリジン及びプロタミン）の、共重合体としての添加は、いくつかのタイプのカチオン性リボソームのトランスフェクションを容易にし、一部の例では、インビトロ及びインビボの両方でいくつかのタイプのカチオン性リボソームのトランスフェクション効率を、多くの細胞株で2〜28倍著しく向上させることができる。（*N J . C a p l e n , e t a l . , G e n e T h e r . 1 9 9 5 ; 2 : 6 0 3 ; S . L i , e t a l . , G e n e T h e r . 1 9 9 7 ; 4 , 8 9 1*を参照されたい。）

【0259】

本発明の実施形態では、輸送ビヒクルは、脂質ナノ粒子として製剤化される。ある実施形態では、脂質ナノ粒子は、1つまたは複数の*c i r c R N A*を1つまたは複数の標的細胞に送達するように製剤化される。好適な脂質の例としては、ホスファチジル化合物（例えば、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシド、及びガングリオシド）が挙げられる。単独で、または他の輸送ビヒクルと組み合わせた、輸送ビヒクルとしてのポリマーの使用も企図される。好適なポリマーには、例えば、ポリアクリレート、ポリアルキルシアノアクリレート、ポリラクチド、ポリラクチド-ポリグリコリドコポリマー、ポリカプロラクトン、デキストラン、アルブミン、ゼラチン、アルギン酸塩、コラーゲン、キトサン、シクロデキストリン、デンドリマー及びポリエチレンイミンが含まれ得る。ある実施形態では、輸送ビヒクルは、米国特許出願第16／065,067号（その全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように脂質として製剤化される。一実施形態では、輸送ビヒクルは、標的細胞への*c i r c R N A*のトランスフェクションを容易にするその能力に基づいて選択される。

【0260】

本発明は、*c i r c R N A*を封入する及び／またはタンパク質産生のためのデポーとして機能し得る標的細胞へのその送達を向上するためのカチオン性脂質を含む輸送ビヒクルとしての脂質ナノ粒子の使用を企図する。企図される脂質ナノ粒子は、1つまたは複数のカチオン性脂質、非カチオン性脂質及びPEG修飾脂質を採用するさまざまな比率の多成

分脂質混合物を含むことによって調製され得る。いくつかのカチオン性脂質が文献に記載されており、それらの多くは市販されている。

【0261】

本発明の組成物及び方法での使用に好適なカチオン性脂質には、国際特許公開WO 2010/053572及び／または米国特許出願第15/809,680号に記載されているもの、例えば、C12-200が含まれる。ある特定の実施形態では、本発明の組成物及び方法は、例えば、(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-15, 18-ジエン-1-アミン(HGT5000)、(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-4, 15, 18-トリエン-1-アミン(HGT5001)、及び(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-5, 15, 18-トリエン-1-アミン(HGT5002)などの、2012年3月29日に出願された米国仮特許出願第61/617,468号(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているイオン化可能なカチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子を採用する。

【0262】

一部の実施形態では、カチオン性脂質N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウム塩化物または「DOTMA」を使用する。(Felgner et al. (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); 米国特許第4,897,355号)。DOTMAは、単独で、あるいは中性脂質、ジオレオイルホスファチジル-エタノールアミンもしくは「DOPE」または他のカチオン性もしくは非カチオン性脂質と組み合わせて、輸送ビヒクルまたは脂質ナノ粒子中に配合することができ、かかるリポソームは、標的細胞への核酸の送達を向上するために使用することができる。他の好適なカチオン性脂質には、例えば、5-カルボキシスペルミルグリシンジオクタデシルアミドまたは「DOGS」、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スペルミン-カルボキサミド)エチル]-N, N-ジメチル-1-プロパニミニウムまたは「DOSPA」(Behr et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); 米国特許第5,171,678号; 同第5,334,761号)、1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパンまたは「DODAP」、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパンまたは「DOTAP」が含まれる。企図されるカチオン性脂質には、1,2-ジステアリルオキシ-N, N-ジメチル-3-アミノプロパンもしくは「DSDMA」、1,2-ジオレイルオキシ-N, N-ジメチル-3-アミノプロパンもしくは「DODMA」、1,2-ジリノレイルオキシ-N, N-ジメチル-3-アミノプロパンもしくは「DLindMA」、1,2-ジリノレニルオキシ-N, N-ジメチル-3-アミノプロパンもしくは「DLeindMA」、N-ジオレイル-N, N-ジメチルアンモニウムクロリドもしくは「DODAC」、N, N-ジステアリル-N, N-ジメチルアンモニウムブロミドもしくは「DDAB」、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロプ-3-イル)-N, N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミドもしくは「DMRIE」、3-ジメチルアミノ-2-(コレスター-5-エン-3-ベーターオキシブタン-4-オキシ)-1-(シス, シス-9, 12-オクタデカジエンオキシ)プロパンもしくは「CLindMA」、2-[5'-(コレスター-5-エン-3-ベーターオキシ)-3'-オキサペントキシ]-3-ジメチル-1-(シス, シス-9', 1-2'-オクタデカジエンオキシ)プロパンもしくは「CpLindMA」、N, N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミンもしくは「DMOBA」、1,2-N, N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパンもしくは「DOcarbDAP」、2,3-ジリノレオイルオキシ-N, N-ジメチルプロピルアミンもしくは「DLindAP」、1,2-N, N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパンもしくは「DLincarbDAP」、1,2-ジリノレオイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパンもしくは「DLincDAP」、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソランもしくは

は「DLin-DMA」、2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキソランもしくは「DLin-K-XTC2-DMA」、及び2-(2, 2-ジ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)-1, 3-ジオキソラン-4-イル)-N, N-ジメチルエタンアミン(DLin-KC2-DMA))(WO 2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28:172-176 (2010)を参照されたい)、またはその混合物も含まれる。(Heyes, J., et al., J Controlled Release 107:276-287 (2005); Morrissey, D V., et al., Nat. Biotechnol. 23(8):1003-1007 (2005); PCT公開WO 2005/121348A1)。

10

【0263】

コレステロールベースのカチオン性脂質の使用も、本発明によって企図される。かかるコレステロールベースのカチオン性脂質は、単独で、または他のカチオン性もしくは非カチオン性脂質と組み合わせて使用することができる。好適なコレステロールベースのカチオン性脂質には、例えば、GL67、DC-Chol (N, N-ジメチル-N-エチルカルボキサミドコレステロール)、1, 4-ビス(3-N-オレイルアミノプロピル)ピペラジン(Gao, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al. BioTechniques 23, 139 (1997); 米国特許第5, 744, 335号)、またはICEが含まれる。

【0264】

20

加えて、トランスフェクション効率を向上させるためのいくつかの試薬が市販されている。好適な例としては、LIPOFECTIN (DOTMA:DOPE) (Invitrogen, Carlsbad, CA)、LIPOFECTAMINE (DOSPA:DOPE) (Invitrogen)、LIPOFECTAMINE 2000. (Invitrogen)、FUGENE (Promega, Madison, WI)、TRANSFECTAM (DOGS) (Promega)、及びEFFECTENE (Qiagen, Valencia, CA)が挙げられる。

【0265】

米国特許第10, 413, 618号に記載されるものなどの、ジアルキルアミノベース、イミダゾールベース、及びグアニジニウムベースの脂質などのカチオン性脂質も企図される。

30

【0266】

他の実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、1つまたは複数の切断可能な脂質、例えば、切断可能なジスルフィド(S-S)官能基を含む1つまたは複数のカチオン性脂質または化合物(例えば、HGT4001、HGT4002、HGT4003、HGT4004及びHGT4005)を含む脂質ナノ粒子に関し、米国仮出願第61/494, 745号(その全教示が、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)にさらに記載される通りである。

【0267】

ポリエチレングリコール(PEG)修飾リン脂質及び誘導体化脂質、例えば誘導体化セラミド(PEG-CER)、例えば、N-オクタノイルスフィンゴシン-1-[スクシニル(メトキシポリエチレングリコール)-2000](C8 PEG-2000セラミド)の、単独での、または輸送ビヒクル(例えば、脂質ナノ粒子)を構成する他の脂質と組み合わせた使用もまた、本発明によって企図される。企図されるPEG修飾脂質には、C6~C20長さのアルキル鎖(複数可)を伴う脂質に共有結合的に付着した最大5 kDaの長さのポリエチレングリコール鎖が含まれるが、これに限定されない。かかる成分の追加は、複雑な凝集を防止し得、循環寿命を延ばし、標的組織への脂質-核酸組成物の送達を増加させる手段も提供し得る、(Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268(1):235-237)、またはそれらは、インビボで製剤から迅速に交換されるよう選択され得る(米国特許第5, 885, 613号を参照され

40

50

たい)。特に有用な交換可能脂質は、より短いアシル鎖（例えば、C 1 4 または C 1 8）を有する P E G -セラミドである。本発明の P E G 修飾リン脂質及び誘導体化脂質は、輸送ビヒクルに存在する総脂質の約 0 % ~ 約 2 0 %、約 0 . 5 % ~ 約 2 0 %、約 1 % ~ 約 1 5 %、約 4 % ~ 約 1 0 %、または約 2 % のモル比を構成し得る。

【 0 2 6 8 】

本発明はまた、米国特許出願第 1 5 / 8 0 9 , 6 8 0 号に記載されているものを含む非カチオン性脂質の使用も企図する。非カチオン性脂質には、ジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C)、ジオレオイルホスファチジルコリン (D O P C)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (D P P C)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (D O P G)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (D P P G)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (D O P E)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (P O P C)、パルミトイルオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン (P O P E)、ジオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (D O P E - m a l)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (D P P E)、ジミリストイルホスホエタノールアミン (D M P E)、ジステアロイル - ホスファチジル - エタノールアミン (D S P E)、1 6 - O - モノメチル P E、1 6 - O - ジメチル P E、1 8 - 1 - トランス P E、1 - ステアロイル - 2 - オレオイル - ホスファチジルエタノールアミン (S O P E)、コレステロール、またはその混合物が含まれるが、これに限定されない。かかる非カチオン性脂質は、単独で、または他の賦形剤、例えばカチオン性脂質と組み合わせて使用され得る。カチオン性脂質と組み合わせて使用する場合、非カチオン性脂質は、輸送ビヒクルに存在する総脂質の 5 ~ 約 9 0 %、または約 1 0 % ~ 約 7 0 % のモル比を構成し得る。

【 0 2 6 9 】

輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）は、複数の脂質及び／またはポリマー成分を組み合わせることによって調製され得る。例えば、輸送ビヒクルは、C 1 2 - 2 0 0、D O P E、コレステロール、D M G - P E G 2 K を 4 0 : 3 0 : 2 5 : 5 のモル比で、または D O D A P、D O P E、コレステロール、D M G - P E G 2 K を 1 8 : 5 6 : 2 0 : 6 のモル比で、または H G T 5 0 0 0、D O P E、コレステロール、D M G - P E G 2 K を 4 0 : 2 0 : 3 5 : 5 のモル比で、または H G T 5 0 0 1、D O P E、コレステロール、D M G - P E G 2 K を 4 0 : 2 0 : 3 5 : 5 のモル比で使用して、調製され得る。脂質ナノ粒子を構成するカチオン性脂質、非カチオン性脂質及び／または P E G 修飾脂質の選択、ならびにかかる脂質の相互の相対モル比は、選択された脂質（複数可）の特徴、目的の標的細胞の性質、送達される c i r c R N A の特徴に基づく。追加の考慮事項には、例えば、アルキル鎖の飽和、ならびに選択された脂質（複数可）のサイズ、電荷、p H、p K a、融合性及び毒性が含まれる。ゆえに、モル比は、それに応じて調整され得る。例えば、一部の実施形態では、脂質ナノ粒子中のカチオン性脂質のパーセンテージは、1 0 % 超、2 0 % 超、3 0 % 超、4 0 % 超、5 0 % 超、6 0 % 超、または 7 0 % 超であり得る。脂質ナノ粒子中の非カチオン性脂質のパーセンテージは、5 % 超、1 0 % 超、2 0 % 超、3 0 % 超、または 4 0 % 超であり得る。脂質ナノ粒子中のコレステロールのパーセンテージは、1 0 % 超、2 0 % 超、3 0 % 超、または 4 0 % 超であり得る。脂質ナノ粒子中の P E G 修飾脂質のパーセンテージは、1 % 超、2 % 超、5 % 超、1 0 % 超、または 2 0 % 超であり得る。

【 0 2 7 0 】

本発明の組成物において使用するための輸送ビヒクルは、当該技術分野で現在公知のさまざまな技術によって調製することができる。マルチラメラベシクル (M L V) は、従来の技術を使用して、例えば、選択された脂質を、好適なコンテナまたは容器の内壁上に堆積させ、脂質を適切な溶媒中に溶解し、次に溶媒を蒸発させて、容器の内側に薄膜を残すことによって、またはスプレー乾燥することによって調製され得る。次に、水相を、ボルテックス運動を用いて容器に添加し、これにより、M L V が形成される。次に、ユニラメラベシクル (U L V) を、マルチラメラベシクルのホモジナイゼーション、超音波処

理または押出によって、形成することができる。加えて、ULVは、洗浄剤除去技術によって形成することができる。

【0271】

本発明のある特定の実施形態では、本発明の組成物は、輸送ビヒクルを含み、circRNAが輸送ビヒクルの両表面上に会合し、同じ輸送ビヒクル内に封入されている。例えば、本発明の組成物の調製中に、カチオン性輸送ビヒクルは、静電相互作用を介してcircRNAと会合し得る。

【0272】

ある特定の実施形態では、本発明の組成物は、診断用放射性核種、蛍光物質、またはインビトロ及びインビボ用途の両方で検出可能な他の物質でロードされ得る。例えば、本発明での使用に好適な診断用物質には、ローダミン-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (Rh-PE)、緑色蛍光タンパク質circRNA (GFP-circRNA)、ウミシイタケルシフェラーゼcircRNA及びホタルルシフェラーゼcircRNAが含まれ得る。

【0273】

一部の実施形態では、輸送ビヒクルの適切なサイズを選択は、標的細胞または組織の部位、及びある程度、リボソームが作製されている用途を考慮に入れる。一部の実施形態では、ある特定の細胞または組織へのcircRNAのトランスフェクションを制限することが望ましい場合がある。例えば、肝細胞を標的とするために、輸送ビヒクルは、その寸法が肝臓の肝類洞を裏打ちする内皮層の開窓よりも小さくなるようなサイズにされ得る。したがって、適切なサイズの輸送ビヒクルは、かかる内皮開窓を容易に貫通して、標的肝細胞に到達することができる。あるいは、輸送ビヒクルは、リボソームの寸法が、ある特定の細胞または組織への分布を制限する、または明示的に回避するのに十分な直径であるようなサイズにされ得る。例えば、輸送ビヒクルは、その寸法が肝類洞を裏打ちする内皮層の開窓よりも大きくなるようなサイズにされ得、それにより、肝細胞への輸送ビヒクルの分布が制限される。一般に、輸送ビヒクルのサイズは、約25~250nmの範囲内である。一部の実施形態では、輸送ビヒクルのサイズは、約250nm、175nm、150nm、125nm、100nm、75nm、50nm、25nmまたは10nm未満である。

【0274】

当該技術分野で公知のさまざまな代替方法が、輸送ビヒクルの集団のサイズ決定に利用可能である。かかるサイズ決定方法の1つは、米国特許第4,737,323号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。リボソーム懸濁液を、バス型またはプローブ型超音波処理のいずれかによって超音波処理することは、直径が約0.05ミクロン未満の小さなULVへの漸進的なサイズ低下をもたらす。ホモジナイゼーションは、大きなリボソームをより小さなリボソームにフラグメント化するためにせん断エネルギーに依存する別の方法である。典型的なホモジナイゼーション処理では、MLVは、選択されたリボソームサイズ、典型的には、約0.1~0.5ミクロンが観察されるまで、標準エマルジョンホモジナイザーを通して再循環される。リボソームベシクルのサイズは、Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10:421-450 (1981)（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるような、準弾性光散乱 (QELS) によって決定され得る。平均リボソーム直径は、形成されたりリボソームの超音波処理によって低下し得る。断続的な超音波処理サイクルを、QELS評価と交互に行って、効率的なリボソーム合成に導いてもよい。

【0275】

加えて、ある特定の実施形態では、本明細書に提供する環状RNAは、1つまたは複数のリボソーム、リボプレックス、または脂質ナノ粒子を使用して製剤化することができる。一実施形態では、環状RNAは、国際公開番号WO2012170930（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの脂質ナノ粒子にて製剤化され得る。一実施形態では、脂質は、国際公開番号WO2012170889（参照に

よりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されているものなどの切断可能な脂質であり得る。一実施形態では、環状RNAの医薬組成物は、国際公開番号2012099755(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているPEG化脂質の少なくとも1つを含み得る。一実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、国際公開番号WO2011127255またはWO2008103276(それぞれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されている方法によって製剤化され得る。脂質ナノ粒子は、コポリマー、例えば、限定されないが、国際公開番号WO2013012476(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されている分岐ポリエーテル-ポリアミドブロックコポリマーなどのブロックコポリマーを用いてコーティングされ得るまたこれと会合し得る。リポソーム、リポプレックス、または脂質ナノ粒子を使用して、環状RNAによって誘導されるタンパク質産生の効率を改善し得る。それはこれらの製剤が、環状RNAによる細胞トランスフェクションを増加させる、環状RNAのインビボもしくはインビトロ半減期を増加させる、及び／または制御放出を可能にすることが可能であり得るためである。

【0276】

ある実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つより多い遺伝子によってコードされるサブユニットから構成されるタンパク質をコードする。例えば、タンパク質は、タンパク質の各鎖またはサブユニットが別個の遺伝子によってコードされているヘテロダイマーであり得る。1つより多いcircRNA分子が輸送ビヒクルにて送達され、各circRNAがタンパク質の別個のサブユニットをコードすることが可能である。あるいは、単一のcircRNAを操作して、1つより多いサブユニットをコードし得る(例えば、一本鎖Fv抗体の場合)。ある特定の実施形態では、個々のサブユニットをコードする別個のcircRNA分子は、別個の輸送ビヒクルにて投与され得る。

【0277】

本発明は、受動的及び能動的標的化手段の両方による標的細胞及び組織の差別的標的化も企図する。受動的標的化の現象は、標的細胞による輸送ビヒクルの認識を向上するための追加の賦形剤または手段の使用に依存することなく、インビボでの輸送ビヒクルの天然分布パターンを利用する。例えば、細網内皮系の細胞による食作用に供される輸送ビヒクルは、肝臓または脾臓に蓄積する可能性が高く、したがって、かかる標的細胞への組成物の送達を受動的に導く手段を提供し得る。

【0278】

あるいは、本発明は、輸送ビヒクルに(共有結合または非共有結合のいずれかで)結合し得る標的化部分を使用して、ある特定の標的細胞または標的組織でのかかる輸送ビヒクルの局在化を助長することを含む、能動的標的化を企図する。例えば、標的化は、標的細胞または組織への分布を助長するために、輸送ビヒクルの中または上に1つまたは複数の内因性標的化部分を含めることによって媒介され得る。標的組織による標的化部分の認識は、標的細胞及び組織における輸送ビヒクル及び／またはその内容物の組織分布及び細胞取り込みを能動的に容易にする(例えば、輸送ビヒクルの中または上にアポリボタンパク質-E標的化リガンドを含めることは、肝細胞によって発現される内因性低密度リボタンパク質受容体への輸送ビヒクルの認識及び結合を助長する)。本明細書に提供するように、組成物は、標的細胞に対する組成物の親和性を向上することができる部分を含むことができる。標的化部分は、製剤化中または製剤化後に脂質粒子の外側の二重層に連結され得る。これらの方法は、当該技術分野で周知である。加えて、一部の脂質粒子製剤は、融合性ポリマー、例えばPEAA、血球凝集素、他のリポペプチド(米国特許出願第08/835,281号、及び同第60/083,294号(参照により本明細書に組み込まれる))を参照されたい)ならびにインビボ及び／または細胞内送達に有用である他の特性を採用し得る。他の一部の実施形態では、本発明の組成物は、改善されたトランスフェクション効率を実証する、及び／または目的の標的細胞もしくは組織に対する選択性の向上を示す。したがって、標的細胞または組織に対する組成物及びその核酸内容物の親和性を向上することができる1つまたは複数の部分(例えば、ペプチド、アプタマー、オリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチド、ビタミンまたは他の分子)を含む組成物が企図される。好適な部分は、任意選択で、輸送ビヒクルの表面に結合または連結され得る。一部の実施形態では、標的化部分は、輸送ビヒクルの表面に広がり得る、または輸送ビヒクル内に封入され得る。好適な部分は (and are)、それらの物理的、化学的または生物学的特性 (例えば、選択的親和性及び／または標的細胞表面マーカーもしくは特徴の認識) に基づいて選択される。細胞特異的標的部位及びその対応する標的化リガンドは、大きく異なり得る。好適な標的化部分は、標的細胞の固有の特徴を利用するように選択され、ゆえに、組成物が標的細胞と非標的細胞とを差別することを可能にする。例えば、本発明の組成物は、(例えば、かかる表面マーカーの受容体媒介認識及びかかる表面マーカーへの結合によって) 肝細胞の認識、または肝細胞に対する親和性を選択的に向上する表面マーカー (例えば、アポリポタンパク質 B またはアポリポタンパク質 E) を含み得る。例として、標的化部分としてのガラクトースの使用は、本発明の組成物を、肝実質細胞に指向させると予想され得る、またあるいは標的化リガンドとしての糖残基を含有するマンノースの使用は、本発明の組成物を、肝臓内皮細胞に指向させると予想され得る (例えば、肝細胞に存在するアシアロ糖タンパク質受容体に優先的に結合し得る糖残基を含有するマンノース)。(Hillery A M, et al. "Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists" (2002) Taylor & Francis, Inc. を参照されたい)。輸送ビヒクル (例えば、脂質ナノ粒子) に存在する部分にコンジュゲートされているかかる標的化部分の提示はそれゆえ、標的細胞及び組織における本発明の組成物の認識及び取り込みを容易にする。好適な標的化部分の例としては、1つまたは複数のペプチド、タンパク質、アプタマー、ビタミン及びオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0279】

特定の実施形態では、輸送ビヒクルは、標的化部分を含む。一部の実施形態では、標的化部分は、受容体媒介性エンドサイトーシスを選択的に特定の細胞集団に媒介する。一部の実施形態では、標的化部分は、T細胞抗原に結合することができる。一部の実施形態では、標的化部分は、NK、NKT、樹状細胞、またはマクロファージ抗原に結合することができる。一部の実施形態では、標的化部分は、群CD3、CD4、CD8、PD-1、4-1BB、CD5、CD7、C1q、及びCD2から選択されるタンパク質に結合することができる。一部の実施形態では、標的化部分は、一本鎖Fv (scFv) フラグメント、ナノボディ、ペプチド、ペプチドベースの大環状化合物、ミニボディ、重鎖可変領域、軽鎖可変領域またはそのフラグメントである。一部の実施形態では、標的化部分は、抗T細胞受容体モチーフ抗体、抗T細胞α鎖抗体、抗T細胞β鎖抗体、抗T細胞γ鎖抗体、抗T細胞δ鎖抗体、抗CCR7抗体、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD5抗体、抗CD7抗体、抗CD8抗体、抗CD11b抗体、抗CD11c抗体、抗CD16抗体、抗CD19抗体、抗CD20抗体、抗CD21抗体、抗CD22抗体、抗CD25抗体、抗CD28抗体、抗CD34抗体、抗CD35抗体、抗CD40抗体、抗CD45RA抗体、抗CD45RO抗体、抗CD52抗体、抗CD56抗体、抗CD62L抗体、抗CD68抗体、抗CD80抗体、抗CD95抗体、抗CD117抗体、抗CD127抗体、抗CD133抗体、抗CD137 (4-1BB) 抗体、抗CD163抗体、抗C1q抗体、抗F4/80抗体、抗IL-4Rα抗体、抗Scα-1抗体、抗CTLA-4抗体、抗GITR抗体、抗GARP抗体、抗LAP抗体、抗グランザイムB抗体、抗LFA-1抗体、抗トランスフェリン受容体抗体、及びそのフラグメントから選択される。

【0280】

一部の実施形態では、環状RNAは、米国特許出願15/809,680に記載されたプロセスに従って製剤化される。一部の実施形態では、本発明は、脂質ナノ粒子に環状RNAを封入するプロセスを提供し、該プロセスは、脂質を予形成脂質ナノ粒子に形成する (すなわち、RNAの非存在下で形成される)、及びその後、予形成脂質ナノ粒子をRNAと組み合わせるステップを含む。一部の実施形態では、新規の製剤化プロセスは、脂質ナノ粒子を予形成するステップを伴わずに調製された (例えば、脂質をRNAと直接組み

合わせた) 同一RNA製剤と比較して、より高い効力(ペプチドまたはタンパク質発現)及びより高い有効性(生物学的に関連するエンドポイントの改善)を、インビトロ及びインビボの両方で有し、潜在的により良好な忍容性を伴う、RNA製剤をもたらす。一部の実施形態では、標的化部分は、リンパ球上のエクト酵素の小分子結合因子である。エクト酵素の小分子結合因子には、A2A阻害剤CD73阻害剤、CD39またはアデシン受容体A2aR及びA2bRが含まれる。潜在的な小分子には、AB928が含まれる。

【0281】

一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、Shobaki N, Sato Y, Harashima H. Mixing lipids to manipulate the ionization status of lipid nanoparticles for specific tissue targeting. Int J Nanomedicine. 2018; 13: 8395-8410. 2018年12月10日に公開に記載されるように、製剤化及び/または標的化される。一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、3つの脂質タイプから構成される。一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、4つの脂質タイプから構成される。一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、5つの脂質タイプから構成される。一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、6つの脂質タイプから構成される。

【0282】

RNAのある特定のカチオン性脂質ナノ粒子製剤の場合、RNAの高い封入を達成するために、緩衝液(例えば、クエン酸緩衝液)中のRNAを加熱する必要がある。これらのプロセスまたは方法では、製剤化後(ナノ粒子の形成後)の加熱は脂質ナノ粒子へのRNAの封入効率を増加させないため、製剤化プロセスの前に加熱を行う必要がある(すなわち、別箇の成分を加熱する)。対照的に、本発明のプロセスの一部の実施形態では、RNAの加熱の順序は、RNA封入パーセンテージに影響を与えるようには見えない。一部の実施形態では、予形成脂質ナノ粒子を含む溶液、RNAを含む溶液、及び脂質ナノ粒子に封入されたRNAを含む混合溶液のうちの1つまたは複数の加熱は、製剤化プロセスの前で生じる必要がない(すなわち、周囲温度で維持される)。

【0283】

RNAは、RNAが脂質ナノ粒子に封入され得るように、脂質溶液と混合される溶液にて提供され得る。好適なRNA溶液は、さまざまな濃度で封入されるRNAを含有する任意の水溶液であり得る。例えば、好適なRNA溶液は、RNAを、約0.01mg/ml、0.05mg/ml、0.06mg/ml、0.07mg/ml、0.08mg/ml、0.09mg/ml、0.1mg/ml、0.15mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、または1.0mg/mlを超える濃度にて含有し得る。一部の実施形態では、好適なRNA溶液は、RNAを、約0.01~1.0mg/ml、0.01~0.9mg/ml、0.01~0.8mg/ml、0.01~0.7mg/ml、0.01~0.6mg/ml、0.01~0.5mg/ml、0.01~0.4mg/ml、0.01~0.3mg/ml、0.01~0.2mg/ml、0.01~0.1mg/ml、0.05~1.0mg/ml、0.05~0.9mg/ml、0.05~0.8mg/ml、0.05~0.7mg/ml、0.05~0.6mg/ml、0.05~0.5mg/ml、0.05~0.4mg/ml、0.05~0.3mg/ml、0.05~0.2mg/ml、0.05~0.1mg/ml、0.1~1.0mg/ml、0.2~0.9mg/ml、0.3~0.8mg/ml、0.4~0.7mg/ml、または0.5~0.6mg/mlの範囲の濃度にて含有し得る。

【0284】

典型的には、好適なRNA溶液は、緩衝剤及び/または塩も含有し得る。一般に、緩衝剤には、HEPES、硫酸アンモニウム、トリス、重炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸カリウムまたはリン酸ナトリウムが含まれ得る。一部の実施形態では、緩衝剤の好適な濃度は、約0.1mM~100mM、0.5mM~90mM、1.0mM~80mM、2mM~70mM、3mM~60mM、4mM~50mM、5m

M～40mM、6mM～30mM、7mM～20mM、8mM～15mM、または9～12mMの範囲であり得る。

【0285】

例示的な塩には、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、及び塩化カリウムが含まれ得る。一部の実施形態では、RNA溶液中の塩の好適な濃度は、約1mM～500mM、5mM～400mM、10mM～350mM、15mM～300mM、20mM～250mM、30mM～200mM、40mM～190mM、50mM～180mM、50mM～170mM、50mM～160mM、50mM～150mM、または50mM～100mMの範囲であり得る。

【0286】

一部の実施形態では、好適なRNA溶液は、約3.5～6.5、3.5～6.0、3.5～5.5、3.5～5.0、3.5～4.5、4.0～5.5、4.0～5.0、4.0～4.9、4.0～4.8、4.0～4.7、4.0～4.6、または4.0～4.5の範囲のpHを有し得る。

【0287】

本発明に好適なRNA溶液を調製するために、さまざまな方法を使用し得る。一部の実施形態では、RNAは、本明細書に記載の緩衝液に直接溶解され得る。一部の実施形態では、RNA溶液は、封入のための脂質溶液と混合する前に、RNAストック溶液を緩衝液と混合することによって生成され得る。一部の実施形態では、RNA溶液は、封入のための脂質溶液と混合する直前に、RNAストック溶液を緩衝液と混合することによって生成され得る。

【0288】

本発明に従い、脂質溶液は、RNAを封入するための輸送ビヒクルを形成するのに好適な脂質の混合物を含有する。一部の実施形態では、好適な脂質溶液は、エタノールベースである。例えば、好適な脂質溶液は、純粋エタノール（すなわち、100%エタノール）に溶解された所望の脂質の混合物を含有し得る。別の実施形態では、好適な脂質溶液は、イソプロピルアルコールベースである。別の実施形態では、好適な脂質溶液は、ジメチルスルホキシドベースである。別の実施形態では、好適な脂質溶液は、エタノール、イソプロピルアルコール及びジメチルスルホキシドを含むがこれに限定されない好適な溶媒の混合物である。

【0289】

好適な脂質溶液は、所望の脂質の混合物をさまざまな濃度にて含有し得る。一部の実施形態では、好適な脂質溶液は、所望の脂質の混合物を、約0.1～100mg/ml、0.5～90mg/ml、1.0～80mg/ml、1.0～70mg/ml、1.0～60mg/ml、1.0～50mg/ml、1.0～40mg/ml、1.0～30mg/ml、1.0～20mg/ml、1.0～15mg/ml、1.0～10mg/ml、1.0～9mg/ml、1.0～8mg/ml、1.0～7mg/ml、1.0～6mg/ml、または1.0～5mg/mlの範囲の総濃度にて含有し得る。

【0290】

任意の所望の脂質は、RNAの封入に好適な任意の比率にて混合され得る。一部の実施形態では、好適な脂質溶液は、カチオン性脂質、ヘルパー脂質（例えば、非カチオン性脂質及び／またはコレステロール脂質）及び／またはPEG化脂質を含む所望の脂質の混合物を含有する。一部の実施形態では、好適な脂質溶液は、1つまたは複数のカチオン性脂質、1つまたは複数のヘルパー脂質（例えば、非カチオン性脂質及び／またはコレステロール脂質）及び1つまたは複数のPEG化脂質を含む所望の脂質の混合物を含有する。

【0291】

11. 標的細胞

一部の実施形態では、標的細胞は、目的のタンパク質または酵素が欠損している。例えば、核酸を肝細胞に送達することが望まれる場合、肝細胞は標的細胞を表す。一部の実施形態では、本発明の組成物は、標的細胞を差別的にトランスフェクトする（すなわち、非

10

20

30

40

50

標的細胞をトランスフェクトしない)。本発明の組成物はまた、肝細胞、上皮細胞、造血細胞、上皮細胞、内皮細胞、肺細胞、骨細胞、幹細胞、間葉細胞、神経細胞（例えば、髄膜、星状膠細胞、運動ニューロン、後根神経節細胞及び前角運動ニューロン）、光受容体細胞（例えば、杆体及び錐体）、網膜色素上皮細胞、分泌細胞、心細胞、脂肪細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、ベータ細胞、下垂体細胞、滑膜ライニング細胞、卵巣細胞、精巣細胞、線維芽細胞、B細胞、T細胞、樹状細胞、マクロファージ、網状赤血球、白血球、顆粒球、及び腫瘍細胞を含むが、これに限定されないさまざまな標的細胞を優先的に標的とするように調製され得る。

【0292】

本発明の組成物は、心臓、肺、腎臓、肝臓、及び脾臓などの標的細胞に優先的に分布するように調製され得る。一部の実施形態では、本発明の組成物は、肝臓の細胞に分布して、肝臓の細胞（例えば、肝細胞）による組成物に含まれる*c i r c R N A*の送達及びその後の発現を容易にする。標的とされる細胞は、機能的タンパク質または酵素を産生する、及び全身的に排泄することができる生物学的「貯蔵所」または「デポー」として機能し得る。したがって、本発明の一実施形態では、輸送ビヒクルは、肝細胞を標的とし得る及び／または送達時に肝臓の細胞に優先的に分布される。ある実施形態では、標的肝細胞のトランスフェクションに続いて、ビヒクルにロードされた*c i r c R N A*が翻訳され、機能的タンパク質産物が産生され、排泄され、全身に分布される。他の実施形態では、肝細胞以外の細胞（例えば、肺、脾臓、心臓、眼球、または中枢神経系の細胞）は、タンパク質産生のためのデポー場所として機能することができる。

【0293】

一実施形態では、本発明の組成物は、1つまたは複数の機能的タンパク質及び／または酵素の対象の内因性産生を容易にする。本発明のある実施形態では、輸送ビヒクルは、欠損タンパク質または酵素をコードする*c i r c R N A*を含む。かかる組成物の標的組織への分布、及び続くかかる標的細胞のトランスフェクションの際、輸送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）にロードされた外因性*c i r c R N A*は、インビボで翻訳されて、外因的に投与された*c i r c R N A*（例えば、対象が欠損しているタンパク質または酵素）によってコードされる機能的タンパク質または酵素を産生し得る。したがって、本発明の組成物は、外因的にまたは組換えにより調製された*c i r c R N A*を翻訳して内因的に翻訳されたタンパク質または酵素を産生し、それによって機能的タンパク質または酵素を産生する（及び該当する場合は排泄する）対象の能力を利用する。発現または翻訳されたタンパク質または酵素は、組換えにより調製されたタンパク質または酵素にはしばしば存在しない場合がある天然の翻訳後修飾をインビボで含み、それにより、翻訳されたタンパク質または酵素の免疫原性がさらに低下することも特徴とし得る。

【0294】

欠損タンパク質または酵素をコードする*c i r c R N A*の投与は、標的細胞内の特定の細胞小器官に核酸を送達する必要性を回避する。むしろ、標的細胞のトランスフェクション及び標的細胞の細胞質への核酸の送達の際に、輸送ビヒクルの*c i r c R N A*内容物が翻訳され、機能的タンパク質または酵素が発現され得る。

【0295】

一部の実施形態では、環状RNAは、1つまたは複数の*m i R N A*結合部位を含む。一部の実施形態では、環状RNAは、1つまたは複数の非標的細胞または非標的細胞型（例えば、クッパー細胞）に存在し、1つまたは複数の標的細胞または標的細胞型（例えば、肝細胞）に存在しない*m i R N A*によって認識される1つまたは複数の*m i R N A*結合部位を含む。一部の実施形態では、環状RNAは、1つまたは複数の標的細胞または標的細胞型（例えば、肝細胞）と比較して、1つまたは複数の非標的細胞または非標的細胞型（例えば、クッパー細胞）にて増加した濃度で存在する*m i R N A*によって認識される1つまたは複数の*m i R N A*結合部位を含む。*m i R N A*は、RNA分子内の相補的な配列と対形成することによって機能し、遺伝子サイレンシングを引き起こすと考えられている。

【0296】

12. 医薬組成物

ある特定の実施形態では、本明細書に提供する治療剤を含む組成物（例えば、医薬組成物）を本明細書に提供する。一部の実施形態では、治療剤は、本明細書に提供する環状RNAポリヌクレオチドである。一部の実施形態では、治療剤は、本明細書に提供するベクターである。一部の実施形態では、治療剤は、本明細書に提供する環状RNAまたはベクターを含む細胞（例えば、ヒトT細胞などのヒト細胞）である。ある特定の実施形態では、組成物は、医薬的に許容可能な担体をさらに含む。一部の実施形態では、本明細書に提供する組成物は、本明細書に提供する治療剤を、他の医薬的に活性な作用物質または薬物、例えば、B細胞抗原を標的とすることができる抗炎症薬物または抗体、例えば、抗CD20抗体、例えば、リツキシマブ、化学療法剤、例えば、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、シスプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ビンブラスチン、ビンクリスチンなどと組み合わせて含む。好ましい実施形態では、医薬組成物は、本明細書に提供する細胞またはその集団を含む。

【0297】

医薬組成物に関して、医薬的に許容可能な担体は、慣習的に使用されるもののいずれかであることができ、化学物理的考慮、例えば溶解度及び活性剤（複数可）との反応性の欠如、ならびに投与経路によってのみ、限定される。本明細書に記載の医薬的に許容可能な担体、例えば、ビヒクル、アジュバント、賦形剤、及び希釈剤は、当業者に周知であり、一般に容易に入手可能である。医薬的に許容可能な担体は、治療剤（複数可）に対して化学的に不活性であり、使用条件下で有害な副作用または毒性を有さないものであることが好ましい。

【0298】

担体の選択は、特定の治療剤、ならびに治療剤を投与するために使用される特定の方法によって部分的に決定されるだろう。したがって、本明細書に提供する医薬組成物のさまざまな好適な製剤が存在する。

【0299】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、防腐剤を含む。ある特定の実施形態では、好適な防腐剤は、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム、及び塩化ベンザルコニウムを含み得る。任意選択で、2つ以上の防腐剤の混合物を使用し得る。防腐剤またはその混合物は、典型的には、総組成物の約0.0001重量%～約2重量%の量で存在する。

【0300】

一部の実施形態では、医薬組成物は、緩衝剤を含む。一部の実施形態では、好適な緩衝剤には、例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウム、ならびにさまざまな他の酸及び塩が含まれ得る。2つ以上の緩衝剤の混合物を、任意選択で使用してよい。緩衝剤またはその混合物は、典型的には、総組成物の約0.001重量%～約4重量%の量で存在する。

【0301】

一部の実施形態では、医薬組成物中の治療剤の濃度は、変動することができ、例えば、約1重量%未満、または少なくとも約1重量%、2重量%、3重量%、4重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%、10重量%、15重量%、20重量%、25重量%、30重量%、35重量%、40重量%、45重量%、もしくは約50重量%以上であることができ、選択された特定の投与様式に従って、流体容量、及び粘度によって主に選択することができる。

【0302】

経口、エアロゾル、非経口（例えば、皮下、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、及び髄腔内）、及び局所投与のための以下の製剤は、単なる例示であり、決して限定するものではない。本明細書に提供する治療剤を投与するために1つより多い経路を使用することができ、ある特定の例では、特定の経路は、別の経路よりも迅速及びより効果的な応

答を提供することができる。

【0303】

経口投与に好適な製剤は、(a) 液体溶液、例えば水、生理食塩水またはオレンジジュースなどの希釈剤中に溶解させた有効量の治療剤；(b) 各々が所定量の活性成分を固体または顆粒として含有する、カプセル、サシェ、錠剤、舐剤及びトローチ；(c) 粉末；(d) 適切な液体中の懸濁液；ならびに(e) 好適なエマルジョンを含むまたはこれからなることができる。液体製剤は、希釈剤、例えば水及びアルコール、例えば、エタノール、ベンジルアルコール及びポリエチレンアルコールを、医薬的に許容可能な界面活性剤の添加を伴ってまたは伴わずに含み得る。カプセル形態は、例えば、界面活性剤、滑剤、ならびに不活性充填剤、例えばラクトース、スクロース、リン酸カルシウム及びコーンスターチを含有する通常のハードシェルまたはソフトシェルゼラチンタイプのものであることができる。錠剤形態は、ラクトース、スクロース、マンニトール、コーンスターチ、ジャガイモでんぷん、アルギン酸、微結晶性セルロース、アカシア、ゼラチン、グアーガム、コロイド状二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、及び他の賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝剤、崩壊剤、湿潤剤、防腐剤、香味料、ならびに他の薬理学的に適合する賦形剤のうちの1つまたは複数を含むことができる。舐剤の形態は、香味料、通常はスクロース、アカシアまたはトラガカントを伴う治療剤を含むことができる。香錠は、当該技術分野で知られているような賦形剤に加えて、不活性塩基、例えばゼラチン及びグリセリン、またはスクロース及びアカシア、エマルジョン、ゲルなどを有する治療剤を含むことができる。

10

20

【0304】

非経口投与に好適な製剤には、製剤を意図されたレシipientの血液と等張にする抗酸化剤、緩衝剤、制菌剤、及び溶質を含有し得る水性及び非水性の等張滅菌注射液、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤及び防腐剤を含み得る水性及び非水性の滅菌懸濁液が含まれる。一部の実施形態では、本明細書に提供する治療剤は、水、生理食塩水、デキストロース水溶液及び関連糖溶液、アルコール、例えばエタノールもしくはヘキサデシルアルコール、グリコール、例えばプロピレングリコールもしくはポリエチレングリコール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、ケタール、例えば2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキソラン-4-メタノール、エーテル、ポリ(エチレングリコール) 400、油、脂肪酸、脂肪酸エステルもしくはグリセリド、またはアセチル化脂肪酸グリセリドを含む滅菌の液体または液体の混合物などの医薬担体中の生理学的に許容可能な希釈剤にて、医薬的に許容可能な界面活性剤、例えば石鹸剤もしくは洗剤、懸濁剤、例えばペクチン、カルボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、もしくはカルボキシメチルセルロース、または乳化剤及び他の医薬アジュバントの添加を、伴ってまたは伴わずに投与できる。

30

【0305】

油は、一部の実施形態では非経口製剤で使用することができ、石油、動物油、植物油、または合成油を含む。油の具体例としては、ピーナッツ、大豆、ゴマ、綿実、トウモロコシ、オリーブ、ワセリン、及び鉱油が挙げられる。非経口製剤での使用に好適な脂肪酸には、オレイン酸、ステアリン酸、及びイソステアリン酸が含まれる。オレイン酸エチル及びミリスチン酸イソプロピルは、好適な脂肪酸エステルの例である。

40

【0306】

非経口製剤のある特定の実施形態での使用に好適な石鹸には、脂肪アルカリ金属、アンモニウム、及びトリエタノールアミン塩が含まれ、好適な洗剤には、(a) カチオン性洗剤、例えば、ジメチルジアルキルアンモニウムハライド、及びアルキルピリジニウムハライド、(b) アニオン性洗剤、例えば、アルキル、アリール、及びオレフィンスルホン酸塩、アルキル、オレフィン、エーテル、及びモノグリセリド硫酸塩、及びスルホサクシネート、(c) 非イオン性洗剤、例えば、脂肪アミン酸化物、脂肪酸アルカノールアミド、及びポリオキシエチレンポリプロピレンコポリマー、(d) 両性洗剤、例えば、アルキル

50

ーβーアミノプロピオネート、及び2-アルキル-イミダゾリン第4級アンモニウム塩、ならびに(e)その混合物が含まれる。

【0307】

一部の実施形態では、非経口製剤は、例えば、約0.5重量%～約25重量%の治療剤を溶液中に含有するだろう。防腐剤及び緩衝液を使用してよい。注射部位での刺激を最小限に抑えるまたは排除するために、かかる組成物は、例えば、約12～約17の親水性-親油性バランス(HLB)を有する1つまたは複数の非イオン性界面活性剤を含有し得る。かかる製剤中の界面活性剤の量は、典型的には、例えば、約5重量%～約15重量%の範囲であるだろう。好適な界面活性剤には、ポリエチレングリコール、ソルビタン脂肪酸エステル、例えばソルビタンモノオレエート、及びプロピレンオキシドとプロピレングリ

10

【0308】

ある特定の実施形態では、注射可能な製剤を本明細書に提供する。注射可能な組成物のための有効な医薬担体の要件は、当業者に周知である(例えば、Pharmaceuticals and Pharmacy Practice, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982)、及びASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4th ed, pages 622-630 (1986)を参照されたい)。

20

【0309】

一部の実施形態では、局所製剤を本明細書に提供する。経皮薬物放出に有用なものを含む局所製剤は、皮膚への適用のために本明細書に提供するある特定の実施形態の状況において好適である。一部の実施形態では、治療剤は、単独で、または他の好適な成分と組み合わせ、吸入を介して投与されるエアロゾル製剤にすることができる。これらのエアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの加圧された許容可能な推進剤に入れることができる。それらはまた、ネブライザーまたはアトマイザーなどの非加圧調製物用の医薬品として製剤化され得る。かかる噴霧製剤も、粘膜を噴霧するために使用され得る。

30

【0310】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供する治療剤は、包接複合体、例えばシクロデキストリン包接複合体、またはリポソームとして製剤化することができる。リポソームは、治療剤が特定の組織を標的とするのに役立ち得る。リポソームは、治療剤の半減期を延長するために使用することもできる。リポソームを調製するために多くの方法が利用可能であり、例えば、Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9, 467 (1980)ならびに米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、同第4,837,028号、及び同第5,019,369号に記載の通りである。

40

【0311】

一部の実施形態では、本明細書に提供する治療剤は、組成物の送達が処置される部位の感作の前に、それを引き起こすのに十分な時間で起こるように、時間放出、遅延放出、または持続放出送達システムで製剤化される。かかるシステムは、治療剤の反復投与を回避することができ、それにより、対象及び医師に対する利便性が増加し、本明細書に提供するある特定の組成物の実施形態に特に好適であり得る。一実施形態では、本発明の組成物は、そこに含有されるcircRNAの徐放に好適であるように製剤化される。かかる徐放性組成物は、対象に、延長された投薬間隔で好都合に投与され得る。例えば、一実施形

50

態では、本発明の組成物は、対象に、1日2回、毎日または隔日で投与される。ある実施形態では、本発明の組成物は、対象に、週2回、週1回、10日毎に、2週毎に、3週毎に、4週毎に、月1回、6週毎に、8週毎に、3か月毎に、4か月毎に、6か月毎に、8か月毎に、9か月毎に、または毎年投与される。

【0312】

一部の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、持続量の時間にわたって、標的細胞によって産生される。例えば、タンパク質は、投与後1時間より長く、4時間より長く、6時間より長く、12時間より長く、24時間より長く、48時間より長く、または72時間より長く産生され得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、投与から約6時間後にピークレベルで発現される。一部の実施形態では、ポリペプチドの発現は、少なくとも治療レベルで持続される。一部の実施形態では、ポリペプチドは、少なくとも治療レベルで、投与後1時間より長く、4時間より長く、6時間より長く、12時間より長く、24時間より長く、48時間より長く、または72時間より長く発現される。一部の実施形態では、ポリペプチドは、患者の血清または組織（例えば、肝臓または肺）において治療レベルで検出可能である。一部の実施形態では、検出可能なポリペプチドのレベルは、投与後1時間より長く、4時間より長く、6時間より長く、12時間より長く、24時間より長く、48時間より長く、または72時間より長い時間にわたる、circRNA組成物からの継続的な発現からである。

【0313】

ある特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、正常な生理学的レベルを超えるレベルで産生される。タンパク質のレベルは、対照と比較して増加し得る。一部の実施形態では、対照は、正常な個体または正常な個体の集団におけるポリペプチドのベースライン生理学的レベルである。他の実施形態では、対照は、関連するタンパク質もしくはポリペプチドに欠損を有する個体または関連するタンパク質もしくはポリペプチドに欠損を有する個体の集団におけるポリペプチドのベースライン生理学的レベルである。一部の実施形態では、対照は、組成物が投与される個体における関連するタンパク質またはポリペプチドの正常レベルであることができる。他の実施形態では、対照は、1つまたは複数の比較可能な時点での、他の治療的介入時、例えば、対応するポリペプチドの直接注射時のポリペプチドの発現レベルである。

【0314】

ある特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質のレベルは、投与後3日、4日、5日、または1週間以上で検出可能である。血清及び／または組織（例えば、肝臓または肺）において分泌タンパク質のレベルの増加が観察され得る。

【0315】

一部の実施形態では、本方法は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の持続的な循環半減期をもたらす。例えば、タンパク質は、タンパク質またはタンパク質をコードするmRNAの皮下注射を介して観察される半減期よりも長い時間または日数にわたって検出され得る。一部の実施形態では、タンパク質の半減期は、1日、2日、3日、4日、5日、または1週間以上である。

【0316】

多くのタイプの放出送達システムが利用可能であり、当業者に公知である。それらは、ポリマーをベースとしたシステム、例えばポリ（ラクチド-グリコリド）、コポリオキサレート、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシブチル酸、及びポリ無水物を含む。薬剤を含有する前述のポリマーのマイクロカプセルが、例えば、米国特許第5,075,109号に記載されている。送達システムはまた、コレステロール、コレステロールエステル及び脂肪酸などのステロールまたはモノ-及びトリ-グリセリドなどの中性脂肪を含む脂質；ヒドロゲル放出システム；シラスティックシステム；ペプチドをベースとしたシステム；ワックス被覆剤；従来の結合剤及び賦形剤を使用する圧縮錠剤；部分的に融合した移植片；などを含む非ポリマーシステムを含

む。具体例としては、これに限定されないが、(a) 浸食システム、ここで、活性組成物は、米国特許第 4, 452, 775 号、同第 4, 667, 014 号、同第 4, 748, 034 号、及び同第 5, 239, 660 号に記載のものなどのマトリックス内の形状にて含有される、ならびに (b) 拡散システムが挙げられ、ここで、活性成分は、米国特許第 3, 832, 253 号及び同第 3, 854, 480 号に記載されるようなポリマーから制御された速度で浸透する。加えて、ポンプをベースとしたハードウェア送達システムを使用することができ、そのうちいくつかは、移植に適合している。

【0317】

一部の実施形態では、治療剤は、標的化部分に連結部分を通して直接的または間接的にコンジュゲートすることができる。治療剤を標的化部分にコンジュゲートするための方法は、当該技術分野で公知である。例えば、Wadwa et al., J, Drug Targeting 3:111 (1995) 及び米国特許第 5, 087, 616 号を参照されたい。

【0318】

一部の実施形態では、本明細書に提供する治療剤は、治療剤が、それが投与される体内に放出される様式が、体内の時間及び位置に関して制御されるように、デポー形態へと製剤化される（例えば、米国特許第 4, 450, 150 号を参照されたい）。治療剤のデポー形態は、例えば、治療剤及びポリマーなどの多孔質または非多孔質物質を含む埋込み型組成物であることができ、治療剤は物質によって封入される、もしくは物質全体に拡散される、及び／または非多孔質物質の分解。デポーは次に体内の所望の位置に埋め込まれ、治療剤は、埋め込み物から所定の速度で放出される。

【0319】

13. 治療方法

ある特定の態様では、状態、例えば、がん、を処置する及び／または予防する方法を本明細書に提供し、該方法は、本明細書に提供する医薬組成物を、それを必要とする対象（例えば、がんを有する対象）に導入することを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に提供する環状 RNA ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に提供するベクターを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に提供するポリヌクレオチド（例えば、本明細書に提供する環状 RNA またはベクター）を含む細胞（例えば、ヒト T 細胞などのヒト細胞）を含む。

【0320】

ゆえに、ある特定の実施形態では、対象（例えば、哺乳動物対象、例えばヒト対象）における疾患を処置する及び／または予防する方法を本明細書に提供する。特定の理論またはメカニズムに拘束されないが、CAR 及び TCR 複合体タンパク質は、生物学的活性、例えば、抗原、例えば、CD19 を認識する能力を有し、その結果、CAR または TCR は、細胞によって発現されると、CAR または TCR が特異的な抗原、例えば CD19 を発現する細胞に対する免疫応答を媒介することができる。これに関して、本明細書に提供するある実施形態は、哺乳動物におけるがんを処置するまたは予防する方法を提供し、該方法は、哺乳動物に、その治療剤、及び／または本明細書に提供する医薬組成物を、哺乳動物におけるがんを処置するまたは予防するのに有効な量で投与することを含む。

【0321】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供する治療剤は、1 つまたは複数の追加の治療剤と（例えば、同じ医薬組成物にて、または別個の医薬組成物にて）共投与される。一部の実施形態では、本明細書に提供する治療剤を最初に投与することができ、1 つまたは複数の追加の治療剤を次に投与することができ、またはその逆も可能である。あるいは、本明細書に提供する治療剤及び 1 つまたは複数の追加の治療剤を同時に投与することができる。一部の実施形態では、本明細書に提供する治療剤と共投与することができる追加の治療剤は、T 細胞活性サイトカイン、例えば IL-2、IL-7、IL-15 及び／または IL-21 である。

【0322】

ある特定の実施形態では、治療剤は、環状RNAまたはベクターによってコードされるCARまたはTCR複合体タンパク質を発現する、本明細書に提供する環状RNAまたはベクターを含む細胞または細胞の集団である。一部の実施形態では、投与された細胞は、処置されている対象に対して同種異系である。一部の実施形態では、投与された細胞は、処置されている対象に対して自家である。

【0323】

ある特定の実施形態では、本方法は、治療剤を投与する前に対象をリンパ球枯渇させることをさらに含む。リンパ球枯渇の例としては、非骨髓破壊的リンパ球枯渇化学療法、骨髓破壊的リンパ球枯渇化学療法、全身照射などが挙げられるが、これに限定されない。

【0324】

一部の実施形態では、対象は、哺乳動物である。一部の実施形態では、本明細書で言及される哺乳動物は、げっ歯目の哺乳動物、例えばマウス及びハムスター、またはウサギ目 (L o g o m o r p h a) の哺乳動物、例えばウサギを含むがこれに限定されない任意の哺乳動物であり得る。哺乳動物は、ネコ科 (ネコ) 及びイヌ科 (イヌ) を含む食肉目からであり得る。哺乳動物は、ウシ科 (ウシ) 及びイノシシ科 (ブタ) を含む偶蹄目、またはウマ科 (ウマ) を含む奇蹄目からであり得る。哺乳類は、霊長目、セボイド目、もしくはシモイド目 (サル)、または類人猿目 (ヒト及び類人猿) であり得る。好ましくは、哺乳動物は、ヒトである。

【0325】

14. 配列

(表3) 例示的なIRES配列。

10

20

30

40

50

配列番号	IRES	配列
1	EMCV-A	ccccctctccctccccccctaacgttactggccgaagccgcttggataaggccggt gtgcgtttgtctatatgttatttccaccataattgccgtcttttggcaatgtgagggcccg aaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtcttccctctcgccaaagg aatgcaaggtctgtgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagac aaacaacgtctgtagcgacctttgcaggcagcgggaacccccacgtggcgacagg tgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaacc ccagtgccacgttgtgagttggatagttgtgaaagagtc aaatggctctcctcaagc gtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatc tggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaacgtctaggcc ccccgaaccacggggacgtggttttctttgaaaaacacgatgataatatggccacaa cc
2	EMCV-B	ctccccctcccccccttactatactggccgaagccacttggataaggccggtgtgc gtttgtctacatgctatttctaccgcattaccgtcttatgtaatgtgagggccagaacc tgacctgtcttcttgacgaacactcctaggggtcttccctctcgacaaaggagtgt aggtctgtgaatgtcgtgaagggaagcagttcctctggaagcttctaaagacaaaaca cgtctgtagcgacctttgcaggcagcgggaacccccacgtggtagcaggtgcctct gcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaacccagtg cacgttgtgagttggatagttgtgaaagagtc aaatggctctcctcaagcgtattcaa caaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcc tcggtgcacgtgctttacacgtgttgagtcgaggtgaaaaaacgtctaggccccccga accacggggacgtggttttctttgaaaaccacgattacaat
3	EMCV-Bf	ttgccagctctgctcgatcgcaggctgggtccgtgactaccactcccccttcaacg tgaaggctacgatagtgccaggcgggtactgccgtaagtccaccccaaaacaaca acaacaaaacaaactccccctcccccccttactatactggccgaagccacttgaat aaggccggtgtgcgtttgtctacatgctatttctaccgcattaccgtcttatgtaatgtg aggggtccagaacctgacctgtcttcttgacgaacactcctaggggtcttccctctc gacaaaggagtgaaggctgtgaatgtcgtgaagggaagcagttcctctggaagctt cttaagacaaaacacgtctgtagcgacctttgcaggcagcgggaacccccacctg gtgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcg gcacaacccagtgccacgttgtgagttggatagttgtgaaagagtc aaatggctct cctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgg gatctgatctggggcctcgggtgcacgtgctttacacgtgttgagtcgaggtgaaaaaa cgtctaggccccccgaaccacggggacgtggttttctttgaaaaccacgattacaat
4	EMCV-Cf	ttgccagctctgctcgatcgcaggctgggtccgtgactaccactcccccttcaacg tgaaggctacgatagtgccaggcgggtactgccgtaagtccaccccaaaacaac

10

20

30

40

50

		aacaacccccctctccctccTccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaa taaggccggtgtgcgtttgtctatatgttatttccaccatattgccgtcttttggcaatgtg agggcccggaacacctggccctgtctcttgacgagcattcctaggggtctttccctct cgccaaaggaaatgaaggctgtgtgaatgtcgtgaaggagcagttcctctggaagct tcttgaagacaacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcggaaacccccacct ggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaaggc ggcacaacccccagtgccacgttgtgagttggatagttgtgaaagagtcacaaatggctc tctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtagcccaattgtatgg gatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgttagtcgaggttaaaaaacg tctaggccccccgaaccacggggacgtgtgttttctttgaaaaacacgatgataat
5	EMCV pEC9	ccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcgtttgtc tatatgttatttccaccatattgccgtcttttggcaatgtgaggcccggaacacctggcc ctgtctcttgacgagcattcctaggggtctttccctctcgccaaaggaaatgaaggctc tgtgaatgtcgtgaaggagcagttcctctggaagcttcttgaagacaaacaacgtct gtagcgacccttgcaggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctgcgg ccaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaaggcggcacaacccccagtgccacg ttgtgagttggatagttgtgaaagagtcacaaatggctcctcaagcgtattcaacaag gggctgaaggatgccagaaggtagcccaattgtatgggatctgatctggggcctcgg tgcacatgctttacatgtgttagtcgagggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccac ggggacgtgtgttttctttgaaaaacacgatgataat
6	ピコビルナ ウイルス	gtaaatfaaatgtctatttacaataatfaaacagaaggagagatgttatgaaccggtttta caaggtttcatacatcgaaaatagcactacctggggcagccgacacactaacatcgtc tgtttaaccagaagtgttactgaaggagggtatttta
7	HCV QC64	acctgccccctaataggggcgacactccgccatgaatcactccccctgtgaggaactact gtcttcacgcagaaagcgtctagccatggcggttagtatgagtgctgtacagcctccag gccccccctcccgggagagccatagtggtctgcggaaccgggtgagtagaccggga attgccgggaagactgggtccttcttggataaacccactctatcccggacatttggg cgtgcccccgcaagactgctagccgagtagcgttgggttgcgaaaggccttgggtga ctgcctgatagggtgcttgcgagtgccccggagggtctcgtagaccgtgcac
8	ヒト コサウイルス E/D	ctacaagctttgtgtaacaaactttgtttggcttttctcaagcttctcactacacaggccc caaagatgtcctgaaggtagcccggtgtatctgaggatgagcaccatcgactaccggg acctgcaaaaatttgcaaacgcatgtggtatccagccccctcctcctcggggaggggg ctttgtcactcagcacagatctgatcaggagatccacctccggtgctttacaccggg gcgtggatttataaattgccaaggcctggcgcacacactaggggactaggttttctt atattttaaaagctgtcaat
9	ヒト コサウイルス F	gtcttaggacgacgcatgtggtatcccagccccgcctacattggcgggggcttttga agcaccagacactggatctgatcaggaggaggtagctgtttacagccccctttaa aattgccaagggtccggccaccaacctaggggactaggttttcttttatttttaattg tcatt
10	ヒト コサウイルス JMY	acatgggggagactgcatgtggcagcttgaacgtgtgtttgacgtctaccttatat ggcagtggtggagtagtgcgaagatgtcaccgtgctttacacggttttgaacccac accggctgtttgacgctcgtagggcagcagggttattttcattaaaattcttcttagc tgcattgagttctattcatgcagacggagtgtactcccgttcttcttggacaggttgcct ccacgccctttgtggtacttaaggtagaccaagtcactgggttggaggtgaagataga gagtcctcttgggaatgtcatgtggtgtgccaggggtttagcagatgccattcgtgtg tgcggtttctctcgtgtgtgacacgagcctcacaggccaaaagcccgcgcgaag gaccgcaatgggtgagtgaccctgactccccctgcatagttttgtattgaaggtaccc aggatattctgtcataaatctctatcacatcagccccaaagatgtcctgaaggtagccct gtgtatctaggatgagcaccaccgactaccggacttgcatttagcagacacatgtgg

10

20

30

40

50

		ttgccagccccacctcttcagagggtggggcttctcactcagcacaggatctgatca ggagccccgctcgtgtgtctttacactcgacgcgggttaaaattgcccaggcctg gcacaacaacctaggggactagggtttcctattttgtaaattatgtcaat	
11	ライノウイルス NAT001	gtgacaatcagccagattgttaacgggtcaagcacttctgttccccggtagcctgtata cgcttcacccgaggcgaaaagtgaagggtatcgttatccgaaagtgcctacgagaag cctagtagcacttttgaagcctatggctggctgctcaactgtttaccagcagtagacct ggcagatgaggctagatgttccccaccagcgatgggtgatctagcctgcgtggctgcct gcacactctattagtgtaagccagaaagtggacaagggtgtgaagagcctattgtgc tcactttgagtcctccggcccctgaatgtggctaatacctaaccctgtagctgttgcaggt aatccaacatgtctgcagtcgtaattgggcaactatgggatggaaccaactactttgggt gtccgtgtttctgtttttctttatgcttgcttatgggtgacaactgtagtattacattgttacc	10
12	HRV14	ttaaaacagcggatgggtatccccaccattgacccattgggtgtagtactctggtagtact gtacctttgtacgcctgtttctcccaaccacccttcttaaaattcccaccatgaaacg ttagaagcttgacattaaagtacaatagggtggcgccatataccaatgggtgtctatgtacaa gcacttctgttcccaggagcgaggtataggctgtaccactgccaaaagcctttaacc gttatccgccaaactacgtaacagttagtaccatctgttcttgactggacgttcgat cagggtgattttccctccactagtgtgtcgtatgaggctaggaaatcccacgggtgac cgtgtcctagcctgcgtggcgccaaccagcttatgctgggacgcccttttaaggac atggtgtgaagactcgcattgtcttgggtgtgagtcctccggcccctgaatgcggctaa ccttaaccctagagccttatgccacgatccagtggttgaagggtcgtaatgagcaattc cgggacgggaccgactattgggtgtccgtgtttctcaattttctcatattgtcttatggt cacagcatatatacatatactgtgatc	20
13	HRV89	ttaaaactgggagtggtgttcccactcactccacccatgcgggtgtgtactctgttatt acggtaactttgtacgccagttttccacccttccccataatgtaacttagaagttgtac aatatgaccaatagggtgacaatcatccagactgtcaaagggtcaagcacttctgttccc cgggtcaatgaggatagctttaccaagcaaaaaccttagagatcgttatccccacac tgctacacagagcccagtagcattttgatataattgggtgtgctcctcgtcaaacc cagcagtagacctggcagatgaggctggacattcccactggcgacagtgtgtccag cctgcgtggctgcctgctcacccttctgggtgagaagcctaattattgacaagggtgtg aagagccgcgtgtcctcagtggtcttctccggcccctgaatgtggctaacttaacc ctgcagccgttgcccataatccaatgggttgggtcgtaatgcgtgaagtgcgggatg ggaccaactactttgggtgtccgtgtttcctgtttttctttgattgcattttatggtgacaatt tatagtgtatagattgtcatc	30
14	HRVC-02	ttaaaactgggtacaggtgttcccacctgtatcaccacgtgggtgtgtgtcttatt ccggtagacttgacgccagtttccacccctcaccgtcgttaacttagaaggttaaca actcgaccaacaggcgggtgtaaacataaccacttacgggtcaagcactcctgttccc cgggtatgcgaggaatagactcctacagggttgaagcctcaagtatcgttatccgattg gtactacgaaaacttagtagtgcttgaaagtccttgggtgtcgtcctcgtatgttc ccctagtagacctggcagatgaggcaggacactcccactggcgacagtgtgtcctg cctgcgtggctgcctgcgcacccttaggggtgcgaagccaagtgcagacaagggtg tgaagagccccgtgtgtaccaatgagtcctccggcccctgaatgcggctaatacaa ccccacagctattgcacacaagccagtggtatgtatgtagtgcgtaatgagcaattgtggga cggaaccgactactttgggtgtccgtgtttcctttattcttatcattctgcttatggtgaca atactgtgaaatagtggtgttacc	40
15	HRV-A21	taaaactggatccaggtgttcccacctggatcctctattgggagttgtactctattattcc ggtaattttgtacgccagttttatcttccccctccccattgtaacttagaaggttatcaata cgaccaatagggtgtagtttagccaaactacaaaagggtcaagcacttctgttccccgt caaagttgatatgtccaacaggcgaaaaacaactgagatcgttatccgaaaagtgc tacgcaaagcctagtaaacctttgaagatttatggttggtcgttccgctatttcccatag	50

		tagacctggcagatgaggctagaaatccccactggcgacagtgtcttagcctgcgt ggctgcctgcgcacccttgggtgcgaagccatacatggacaagggtgaagagc cccgtgtgtcactttgagtcctccggccccgaatgtggctaacctaacctgcagc tagtgcagtgaatccaacatgttgctagtcgaatgagtaattgcgggacgggaccaac tactttgggtgtccgtgtttcactttttccttttaataatgttatgggtgacaatataatagct atataatggacacc	
16	サリウイルスA SH1	ttcccctgcaaccattacgttactcgcagtgtgcattgagtggtgcatgtgtgaacaaa cagctacactcacatggggcggggtttcccgcctacggcttctcgcgagggccac ccctcccctttctccataactacagtgtttgtaggtaagcactcctgatccccgcgg aagctgctcacgtggcaactgtggggaccagacaggttatcaaaaggcaccgggtct ttccgccttcaggagatccctgctagcgaattctagtagggctctgtgtgggtgccaacc tccccaaatgcgcgtgcgggagtgtcttcccaactcacctagatcctctcatg tgtgtgcttggtcagcatatctgagacgatgtccgctgtcccagaccagtcagtaac ggacggggcagtgctgtagtcgtctccgctgtccgctgcatgtttggtgaaccg gtggggtgaaggtgtgtgtcccaacggcggtactcaggggatacctcaaggcacc aggaaatgccaggaggatccccgttcacagcgggatctgacctggggtaaatgt ctgcgggggtcttcttggcccacttctcagttttcagg	10
17	サリウイルス FHB	acatggggggtctgcggacggcttcggcccaccgcgacaagaatgccgtcatctg tctcattaccgtattccttcccctccccgcaaccaccagcttactcgcgcacgtgtt gagtggtcacgtgcgtgttccaaacagctacaccacaccttcggggcggtgtgtc ccgcccctcgggttctcgcggaacccccctcctctctcttctatccgcccac ttccataactacagtgtttgtaggtgagcaccctgacccccgcgggaagtgtga acgtggcaactgtgggatccaggcaggttatcaaaaggcaccggcttctccgcttc aggagtatcttgcgggtgaattccggtagggctctgcttgggtgccaacctccccaa atgcgcgtcggggagtgtcttcccaactcattagtaacctctcatgtgtgtctt gtcagcatatctgaggcgacgttccgctgtcccagaccagtcagcaatggacggg ccagtgtcgtagtcgttccggtttccggcgcatgtttggcgaaacgctgaggtaa ggttggtgtgccaacggcgtaatttggtgatacctcaagaccaccaggaatgcc gggaggtacccacttcggtgggatctgacctgggctaattgtctacggtggttctc ttgctccacttcttcttctggtcatg	20
18	サリウイルス NG-J1	tatggcaggcggtgtgtggacggcttcggcccaccacagcaagaatgccatc tgtctcacccecaatttccctttcttcccctgcaaccattacgttactcgcagtgtcat tgagtggtgcatgtgtgaacaaacagctacactcacatggggcggtgttcccgc ctacggcctctcgcgaggccacccttccctcccccttataactacagtgtttgtag gtaagcatcctgatccccgcgggaagctgtcacgtggcaactgtggggaccaga caggttatcaaaaggcaccgggttctccgcttcaggagatccctactagtgaattcta gcggggctctgtgtgtgccaacctccccaaatgcgcgtcgggagtgcttcc ccaactaccctagatcctctcatgtgtgtgtgtgtcagcatatctgagacgatgtcc gctgtcccagaccagtcagtaatggacgggagtgctgtgtagtcgttccggtt gtccggggcatgtttggtgaaccggtggggtgaaggtgtgtgtgccaacggcggtac tttggtgacacctcaagaccaccaggaatgccaggaggtacccacctcacgtg ggatctgacctgggctaattgtctacggtgttcttctgttccacttcttctgttca cg	30
19	ヒト パレコウイルス 1	ttgaaaggggtctcctagagagcttggccgtcgggccttatacccgacttgcgtgag ttctctagagagccctttccagccctgagggcgtgtgtaataaaagcctcaaac gtaactaacacctaaagatcatgtaaacctatgcctggtctccactatcgaaggc aacttgcaataagaagagtgggatcaagacgcttaagcatagagacagttttcttct aaccacatttgtgtgggtggcagatggcgtgccataactctaatagtgagatacca cgcttggtagccttatgctcacacagccatcctctagtaagttgtgagacgtctggtga	40

		cgtgtgggaacttaltggaaacaacatttctgctgcaagcatcctactgccagcggaaa aacacctggtaacaggtgcctctggggccaaaagccaagggttaacagacccttttag gattgggtctaaacctgagatgttgggaagataatttagtacctgctgatctggtagttatg caaacactagtgtgaaggccatgaaggatgccagaagggtaccgtaggtaacaag tgacactatggatctgatttggggccagatacctctatcttggtagctgggttaaaaaac atctaattggccaaacccgggggggatccccgggttctcttattctatcaatgccact	
20	クロヒウイルス B	gtataagagacaggtgttgccttgccttgcgactggcatcttgggaccaacccccctt tccccagccatgggttaaatggcaataaaggacgtaacaacttgaaccattaaagcttt gtaattttgaaccactaaagcttggcacataatgaaccatcaagcttggtagtccag caggaggttgcagctttagccgaaatgggctcgacccccatagtaggatactt gatttgcattccattgtgacgtgcaaacctctacacatagaggcttgccttgcactaaa cacctgagtagactgtgtaccttagaccctatagtagggaggaccgttgttctcaat aacctacataataggctaggtggcatgcccaattgcaagatcccagactgggggt cggctggggcagggttagatccctgttagctactgcctgatagggtggtgctcaacct gtgtagttaaattgagctgtcatatacc	10
21	Yc-3	actgaagatcctacagtaactactgccccaatgaacgccacagatgggtctgctgatg actacctatcttagtctagttgaggttgaagttagccgggttttagaagaaccagtttc tgaacattatcatccccagcatctattctatacgacacaagatagatagtcacagcagac acatctgtgctactgcttagataggttgcggctgggtcaacttagattggtataaccagttg agtggcaa	
22	ロサウイルス M-7	tatgcatcactggacggcctaacctcggctcgtggcttcttggcatttcagcgtacca ggcttctggctcggcaggcgttgattagtaggtgcactgtctaagtgaagacagcag tgctctctgtgaaaagttagacactcttcagggtttagcgaactcaaggctagcg gatttccccgtgtgtaacacacgcctctaggccagaaggcacgggtgtgacagca cccccttagtgctggttcttccccaccagcactgatttggatttctctagtaacgg acaagcatggctgcttfaagcattcagtcgctcggggctgaaggatgccagaag gtaccgcaggtaacgataagctcactgtgatctgatctggggctgcgggctgggt gtcttccaccagccaaaacccgtaaacggtagtcgcaggttaaaaaacgtctaggc cccacccccaggggatgggggttcccttaaacctcacaagttcaac	20
23	シャンバウイルス A	tgaanaaggggcgaggggtggtggtggttactaaataccaccatcgccctgcactt ccctttccccctgtggctcagggtcacttagcccccttgggttaccagtagtttctac ccctgggcacagggttaactatgcaagacggaacaacaatctcttagtccccctgcc gatagtgggctcgacccccatgttaggagtggaagggacggagttagccgata cggggaagagtggtgcggtcacaccttaattccatgagcgtcggaagaaggagct gtgaacaatggcgacctgaaccgtacacatggagctccacaggcatggtactgtta gactacgcagcctggttgggagtggtataccctgggtgagccgccagtgaatggg agttcactggttaacacacactgcctgatagggtcaggcctctgtccccgccgtaat gaggtagaccataatgcc	30
24	パシウイルスA	ggggctggatattctggcgtgcaactgcttttgaccagtggctctgggtaacttagcc aaagtgtccttctcccccttccctattatattttagtggcttctgtgtctgttttagttatata taagatcctttccgccgatatagacctgacagtctagttaggaggattggtgatatta atttggccccagaagagtgaaccgtgacacatagaaccatgagtacatgtgtatccgtg gaggatcgccccgggactggattccataccattgccatcccaacaagcggagggtat taccactatgtgcacgtctgcagtgaggagctgcagatttagtcatactgcctgatag ggtgtgggctgcactctgggtactcaggctgtttatataat	
25	パシウイルスA 2	gctggacttctggctgcgcaactgcttttaaccagtggctctgggttacttagccaaaa cccccttccccgtacctagtgtgtgtgtattattttgtgtgtttttaaattttatata taagatcctttccgccgatatagacctgacagtctagttaggaggattggtgatatta atatgccccagaagagtgaccgtgacacatagaaccatgagtacatgtgtatccgtg	40

		gaggatcgcccgaggactggattccataccattgccatcccaacaacggagggtat taccgcgtatgtgcgctctacagtgggaatctgtagatttagtcatactgcctgatagg gtgfgggcctgcactctggggactcaggctgtttatataat	
26	エコーウイルス E14	ttaaacagcctgtgggtgttcccatccacagggccactggcgccagcactctgg tattgcgtaccttagtgcgctgtttatataccgtccccaacgtaacttagacgc atgtcaacgaagaccaatagtaagcgcagcacaccagctgtgtccggtaagcactt ctgttaccgggaccgagtatcaataagctactcacgtggctgaaggagaaaaagttc gttaccgaccaattacttcaagaacctagtaacacatgaagggtgcgagtggttc gctccgcacaacccagtgatagtcaggctgatgagtcaccgattccccacgggtg accgtggcggtggctgcgctggcgccctgccatgggaaacccatgggacgcttc aatactgacatggtgcgaagagtctattgagctaattgtagtcccgccccctgaat ggcgtaactcctaactgcggagcagataccacacaccagtgggcagctctgctgaa cgggcaactctgcagcgggaaccgactacttgggtgtccgtgtttctcttatacttatac tggtgcttatgtgacaattgagagattgtaccatagctattggattggccatccg gtgacaaatagagcaattgtgtattgtttgtgttctgtgccattaaattacaaggttcta aacacccttaattcttattatagcattcaacacaacaaa	10
27	ヒト パレコウイルス 5	gtacattagatgcgtcatctgcaactttagtcaataaattacctcaatgtcattaccaac attccctaccttttactaacacctaagacaacaagtacctatgcctggctccactattc gaaggcaacttgcaataagaagagtgaattaaagacgcttaaagcatagagctagtta tcttttctaacccacaaaagtttgggggtggcagatggcgtgccataactctattagtga gataccatgcttggatcttatgctcacacagccatccttagtaagttgataaggtgtc tgggtgatgtgtggaaactcacatgaaccattaattaccgtaaggtatcctatagccagc ggaaacacatctggtgacagatgcctctggggccgaaagccaaggtttaacagacc tataggattggttcaaacctgaattgatgtgattgtatagtaacgtgtgatctggtga acagtgtcaactagtgttaaggcccacgaaggatgccagaaggtagccgtaggt aacaagtacactatggatctgatctggggccagctacctctatcatgtgtgattgtgt aaaaaacgtctagtgggccaacccaggggggatccctgggttcttttacctaataca agccact	20
28	アイチウイルス	tttgaanaaggggtgggggggctcggccccctaccctctttccgggtggtctgtgtc ccggaccaccgttactccattcagcttcttcggaaacctgttcggaggaaftaaacgggc accatactcccccccccccccttttgaactaagtatgtgtgtcgtgacttgaactcc acggaacggaccgatccgttgggtgaacaacagctaggtccacatctcccttccct gggaggggccccgccccccacatctccccccagcctgacgtatcacaggctgtgt gaagccccgcgaaagctgctcacgtggcaattgtgggtcccccttcatcaagaca ccaggtcttccctccttaaggctagccccggcgtgtgaattcacgttgggcaactagt gtgtcactgtgcgtcccaatctcggccggagtgctgttcccccaagccaaacccct ggcccttactatgtccttgcaagcatactgagaaggtgttccgctgtggtgcca cctggtgacaggtgccccagtggtgtaaccttcttccgtctccggacggtagtgattg gttaagatttgggtgaagggtcatgtgccaacgccctgtcgggatgaaacctctactg ccctaggaatgccaggcaggtacccacctccgggtgggatctgagcctgggcta tgtctacgggtagtttcatcatttccaatccttttatgtcggagtc	30
29	A型肝炎 ウイルスHA16	ttcaagaggggtctccgagttttccggaacccctcttggagtcattggtgagggga cttgatacctcaccgccgtttgcctaggtataggtataatttcccttccctgtccttccc ctatttccctttttgtttgttaataatattcctgcaggttcagggttctttaatctgtttctc tataagaacactcaattttcacgctttctgtctcttcttccagggtctccccctgcct aggctctggccgttgcgccggcggtcaactccatgattagcatggagctgtagg agtctaaattggggacgcagatgtttgggacgtgccttgcagtgttaacttggcttca tgaacctcttctatctccacaaggggtaggctacgggtgaaacctcttaggctaatact tcaatgaagagatgccttggatagggtaacagcggcggtatattgggtgagttgttaaga	40

		caaaaaccattcaacgccggaggactggctctcatccagtgatgcattgaggggaatt gattgtcagggtgtctctagggttaatctagacctctgtgcttagggcaaacatat ttggccttaaatgggacctgtgagaggggtccctccattgacagctggactgttcttt ggggccttatgtgtgtttgcctctgaggtactcaggggcatttaggttttctcattctt aaataata	
30	フォピウイルス	gggagtaaacctcaccaccgtttgccgtggtttacggctacctatftttgtagtaaatat taattcctgcagggtcaggtctctgaattatgtccacgctagtgccactctcttaccata agtgacgccttagcggaacctttctacacttgatgtggttaggggtfacattatttccctg ggccttctttggccctttttccctgcactatcattcttctccgggtctcagcatgcc atgttccgaccggtgcgcccgggggtaactccatggttagcatggagctgtagg ccctaaaagtgtgacactggaactggactattgaagcatacactgttaactgaacat gtaactccaatcgatcttctacaagggttaggctacgggtgaaccccttaggttaata ctcatattgagagatactctgataagggttaagggtgctggataatggtgagttaacgaca aaaaccattcaacagctgtggccaacctcatcaggtagatgcttttggagccaagt cgtagggtgtgtgtgaaatgcttcagtgaagggtccctcccgaaggctcgtagg gtaatacaggggcaggttaggttccacaattacaattgaa	10
31	CVA10	gctctccgatctgggtgttcccacccacaggggccactgggcccagcactctgat tccacggaatctttgtgcgctgttttacaaccttcccaatttgaacgtagaagcaata cacactactgatcaatagtaggcatggcgccagtcagtcagatcaagcacttctg ttccccggactgagtatcaatagactgctcacggttgaaggagaaaaagttcgtt accggcctaactacttcgagaaacctagtagcaccatggaagctgaggagtgttgc tcagcactttccccgttagatcaggtcagtgactgcaatccccacggcgacc gtggcagtggtgcgttggcgccctgcctatgggcaaccatagagcgtctaatg tggacatggtgcgaagagtctattgagctagttagtctccggcccctgaatgcg gctaactcaactgcggagcacatgcttcaaccaggaggtggtgtgtcgtaacgg gtaactctgcagcgaaccgactactttgggtgtccgtgttctctttatcttatattggc tgcttatggtgacaatcacgaattgttgcataatagctattggattggccatccggtgc taacagagctattgtatacctattgttggaattactcccctatcataaatctctgaaca ctttgtgctttatactgaacttaaacacacgaaa	20
32	エンテロ ウイルス C	ttaaaccagctctggggtgttcccacccagaggcccacgtggcgccagtagacc gtaccacgggtaccctgtacgctgttttatactcccctcccgtaaactagaagcac gaaacacaagttcaatagaagggggtacagaccagtagaccacacgaacaagcactt ctgttccccgggtgaggtcacatagactgtcccacgggtcaaaagtactgatccgtta tccgctcagctacttcgaaagcctagtagacccttggaaatctacgatgcgttgcgtc agcactcagccccggagtgtagcttaggctgatgagctggacgttccccactggtga cagtgttccaggctgcgttggcgccctacctgtgttccaaaaccacaggacgctagt agtgaacaagggtgtgaagagcccactgagctacctgagaatctccggcccctgaat gcggctaataccaaccacggagcaggtaatcgaaccagcggtcagcctgtcgtga acgcgtaagtctgtggcggaaccgactactttgggtgtccgtgttctctttattttatgg tggctgcttatggtgacaatcatagattgtatcataaagcaattggattggccatccg gagtgagctaaactatctatttctctgagtggttgattcgtttacccacattctgaacaat cagcctcattagtggtaccctgttaataagacgatcatcacg	30
33	エンテロ ウイルス D	ttaaaccagctctggggtgttcccacccagaggcccacgtggcgccagtagtactccg gtaccccggtaccctgtacgctgttttatactccccttcccaagtaactttaagaagaaa taactaatgttaacaggaggggtacaaccagtagaccacacgaacacacacttct gtttccccgggtgaagttcatagactgtaccacggttgaagcgatgaatccgttacc cgcttaggtacttcgagaagcctagtatcatcttgaatcttcgatgcgttgcgatcagc acttaccggagtgtagcttgggtcagtgagcttgacacccacacggcgacgt gtccagggtgcgttggcgccctaccatggctagcaccatgggacgctagtgtga	40

		acaagggtgcgaagagcctattgagctacctgagagtccctcggccctgaatgcggc taatcccaaccacggagcaaatgctcacaatccagtgaagggtttgtcgtaatgcga agtcgtggcgggaaccgactactttgggtgtccgtgtttcctttttattatggctgctt atgggtgacaatctgagattgttatcatatagctattggattagccatccgggtgatatctga aattttgccataactttttcacaatcctacaacattacactacactttctctgaataattga gacaactcata	
34	エンテロ ウイルス J	ttaaataagcctcagggtgttccaccctgaggggccacgtggtgtagtactctggtg ttacgggtacctttgtacgcctattttatacccccttcccaagtaattagaagcaagcac aaaccagttcagtagtaagcagtacaatccagtactgtaatgaacaagtacttctgttac cccggaagggtctatcggttaagctgtaccacggctgaagaatgacctaccgttaac cggctacactactcagaagcctagtaatgccgttgaagttttattgacgttacgctcag cacactaccccggtgtgattttggctgatgagtcacggcactccccacggcgaccg tggcgtggctgcgttggcggccaaccaaggagtgaagctccttggacgtcatatta cagacatggtgtgaagagcctattgagctaggtgtagtctccggccctgaatgcg gctaatacctaactccggagcatatcggtgcgaaccagcacttgggtgtgtgaatacgt aagtcgtggagcgggaaccgactactttgggtgtccgtgttctgttttaacttttatggctg cttatgggtgacaatttaacattgtaccatatagctgttgggtggccatccggattttgta taaaaccatttctctgtgccttgacctttaacacatttgaacttctttaaaccctttatta gtccttaataactaaga	10
35	ヒト ペギウイルス 2	aactgttgttagcaatgcgcataattgctacttcggtagcctaattggtaggcgccc gccgaccggcccccgaaggcctagtaggacgtgtgacaatgccatgagggatcat gacactggggtgagcggaggcagcaccgaagtcgggtgaactcactccagctgc gaccactggcttggctgtcatggaggcatccccacgggaacgctgacgtgcaa agggatgggtccctgactggtgcatgcgcggcaccactccgtacagcctgatag ggtggcggcgggccccccaggtgtgacgtccgtggagcgcaac	20
36	GBV-C GT110	tgacgtgggggggtgatTTTccccccggcactgggtgcaagccccagaaac cgacgcctatctaagtagacgcaatgactcggcggcactcggcgaccggccaaaa ggtggtggatgggtgatgacagggttggtaggtcgtaaatcccgtcatcttggtagc cactatagggtgggtcttaagagaagggtcaagattcctcttacgctcggcgagaccg cgacgggtccacaggtgttggccctaccggtgtgaataaggggccgacatcaggc	
37	GBV-C K1737	gacgtgggggggtgatccccccTTTggcactgggtgcaagccccagaaac gacgcctatctaagtagacgcaatgactcggcggcactcggcgaccggccaaaa ggtggtggatgggtgatgccagggttggtaggtcgtaaatcccgtcatcttggtagc cactatagggtgggtcttaagggttggtaaggctccctctggcgttggcgagaaag cgacgggtccacaggtgttggccctaccggtgtgaataaggggccgacgtcaggct cgtcgttaaacggagccactaccacctgggcaaacacggccacgtacggtcca cgtcggccttcaatgtctcttaccataaggcttagccggcgagttgacaaggacca gtgggggctggcggttaggggaaggaccctgccgtgcccttcccgtgaggtg ggaaatgc	30
38	GBV-C Iowa	tgacgtgggggggtgatccGccccccggcactCggtgcaagccccataaac gacgcctatctaagtagacgcaatgactcggcggcactcggcgaccggccaaaa gtggtggatgggtggtgacagggttggtaggtcgtaaatcccgtcatcttggtagc actatagggtgggtcttaagagaagggtcaagactccttctgctcggcgagaccgc gcacgggtccacaggtgttggccctaccggtgtgaataaggggccgacgtcaggctc gtcgttaaacggagcccgacccacctgggcaaacgacggccacgtacgggtccac gtcggccctca	
39	ペギウイルスA 1220	ttagcaatgcgcataattgctacttcggtacgcctaattggtaggcgcccggccgacc ggccccgcaagggcctagtaggacgtgtgacaatgccatcggggatcatgacactg gggtgagcggaggcagcaccgaagtcgggtgaactcactccagtgcgaccacc	40

		tggcttggctgcttcatggaggcatgccacgggaacgctgacgtgcaaaaggatg ggtccctgcactgggtgccatgcgcgcaccactccgtacagcctgatagggtggcg ggggggccccccagtgtagctccgtggagcgcaac
40	パシウイルスA 3	atfttctggccgtgtagctgctttgaccagtggctctgggttacttagccaaatccccctt ccttcacccttttaaaattgatggtctgtgtgtttgtttgtcttcttaaataatataagat ccttcccgcgatacagacctgcacagtctggtgtaggagggttggtgttattaattgc cccagaagagtgacctgacacatagaaccatgagtagatgtgtatccgtggagga tcgcccgggactggattccatatccattgccatcccaacaagcgagggtatacca ctatgtgcgcgtttgacgtgggaatctgcaaaatttagtcatactgcctgatagggtgtgg gcctgcactctgggttactcaggctgttcataataat
41	サペロウイルス	ccccccacccttaagggtggtgtatccacataccccaccctcccttccaaagggtgac ggacaactggatttgaactaacggcaagtctgaatggtatgatttgatactgtttaaagc gcagtagcgtggcgagctatgaaaaatcgcaattgtcgatagccatgttagtgacgc gcttcggcgtgctccttgggtgattcggcgactggtacaggagagtaggcagtgcgc tatgggcaaacctctacagtattacttagagggaatgtgcaattgagacttgacgagcg tctctttagatgtggcgcatgctcttggcattaccatagtgcgttccagggttgggaaa cctggactgggcctatactacctgatagggtcgcggctggccgcctgtaactagtata gtcagttgaaaccccc
42	ロサウイルス B	gtctctttagtctctatgcttcagagagcgggtgaactgacaccgttgccttctgcacagc ccttcgtgccgtcttcccggttctgcacagcgttgggcatcatggctagttaggctaag atagtggatgatctagtgaacagtttggattgttggagttttagcgtatgtagtagtg tgtgtggacctccccacgtggtaaacacgtgccccacaggccaaaagccaagggtgtg aaagcaccctactagtcacagactcacccatctgggaactcctctcatgaaaaatctt agtaactttgattcggctattcatcaacctctctagtaagggtgaaggatgccggga aggtaccgcaggtaacgataagctactgtgatctgacccgggcttgggtgcgcac cgtctgtccggcgtagccaggttaaaaacgtctaggcccttccacccaagggtgatt ggggtttcccaatcattgaaagtctact
43	バクンサ ウイルス	tttgaacgccacctcggagcgatataccggggaccctcccttttcttctaccttc ttccaaatttccctcttcccttgttatttgggttggatttctggacatgactcggacgga tctatctcatttgccttgtgtctgtccaccagtggcatgggtcgaaagatcatcaacactg gacgtgactgtaatggccaaacgtgccacaggggaaacctgcccgtcgtctgtag cggcgggtggacgtggtggaccctctccctgctcataaaacttgggtaggtgaagg gttcaagcgacgttgcctgagggcgcatccggatgggtgggaaccaacaactag gctgtaatggccgacctcagggtggtgagctagggtgctgcacaaaagggactc gattcgatatccggcctgtagcctagtgcagtggaactcgtagtgggaatctacga ctggcctagtacagggtgatagccctgttccacgcccacctgtttagggacaccc cccc
44	トレモウイルス A	tttgaagaggcctccggagtgtccggaggctctctttcgaccaaccatactgggg ggtgtgtgggacctacctggagtgcacggtatataatgcattcccgcattggcaagg cgtgctaccttggcccttgacgcattggtatgcgtcatcatttgccttgggttaagccccata gaaacgaggcgtcacgtgccgaaaatcccttgcgtttcacagaacctcctaacct gggtgtagtatgggaatcgtgtatgggatgattaggtatctctgtagagggtatagg gtgccattcaaatccaggagtagtctggtctgacattgggacattgtatgaaccgg acctgttgcagtatccgggtgtctgtattgtacgggtatccgtcttggcacactgaa agggtattttgggtaactcttctactgcctgatagggtggcgtgcccgccacgag agattaagggtagcaatttaaac
45	ブタ パシウイルス]	gcttttgaccagtggctctgggttacttagccaagtccttcttcttatttctactagtattatg ttgtgtgtgtctgtttgtttgttaattgtatacaagatccttcccgccgacacagacct cgacagtctgggtgtaggagggttgggtgataattaatttccccaaaagagtaccgtgat

10

20

30

40

50

		acgtggaaacatgagfacatgtgtatccgtggaggatcggcgggactggattccat atcccattgccatcccaacaaacggagggtataccaccacgtgcgcgtttgcagtg ggaatctgcaaatftagtcatactgcctgatagggtgtgggcctgcactttgggtactc aggctgttcataataat
46	PLV-CHN	acatgggggtatgtgtctgtcctgtttgttgaacaatatataagatcctttccgccgata tagacctcgacagtctagtgtaggaggattgggtatagtaacttggccagaaagagtg accgtgacacatagaaacatgagfacatgtgtatccgtggaggatcggcgggact ggattccatatccattgccatcccaacaaacggagggtataccactatgtgcgcgtt tgcagtgggagcctgcaaatftagtcatactgcctgatagggtgtgggcctgcactctg gggtactcaggctgtttatataat
47	パシウイルスA (長い)	tgaaaaagtgtgtgtgcagctggattttccggctgtgcaactgctttgaccagtggctc tgggttacttagccaaattcctttcccttatecctattgtttgtgtgtgtgtttgt ttgtcttaactatatacaagatccttcccgccgatacagacctgacagtctgggtag gaggggtgtgtgttataaatttccccaaaagagtaccgtgacacgtggaaacatga gtacatgtgtatccgtggaggatcggcgggactggattccatatccattgccatccc aacaacggagggtataccaccacgtgcgcgttgcagtgggaatctgcaaatftag tcatactgcctgatagggtgtgggcctgcactttggggactcaggctgtttatataat
48	シシニウイルス	gtgtcattaaggtgtgtttggaagttcgaattagctgtgtgtgtgattagtagaccccc tggagggtaccaattcggatctgaccagggaacctgtactataccgctccggtaattc gggtttaaaacaatgaacgtcaccacacaattcttctcattttatctcatcattgtcttc ctatttaccgattacactcgaattccttggatgttcctggagatttccctggtaacctggac cctcattattgtgtgtttcaccagcgagctgtcccaattgcttattatttgcgttacaa cttcgtcctaataattttctgttgatcgggttgattgagctcccggtatcctgccattc aac
49	ヘパシウイルス K	gggaacaatgttccgtccgcggaacgactctagccatgagctagtagagtgctgcgtg ccaccattagcacaaaaaccactgactgagccacaccttcccgaatcctgagta caggacattcgtcgcgacgacgatgagcctccatgccgagaaaattgggtataccc acgggtaagggggtggccaccagcgggaatctgggggctggtcactgactatggtga cagcctgatagggtgtcgtccgcagcgtcagtggtatgcggctgttcattggaac
50	ヘパシウイルス A	acctcgtgctaggcacggtgcgttgcagcgttttgcgttgcagtcgctacacgcgt cgtccaacgcggagggaacttcacatcaccatgtgtcactccccctatggagggttcc accccgcttacacggaaatgggttaaccataccaaaagtaggggtatgcgggtcctc ctaggggccccccggcaggtcaggagctggaattcgtgaattcgtgagtacacg aaaatcgcggcttgaacgtctttgacctcggagccgaaatttgggctgtccccacga aggaaaggcgggggctgttggccgccgccccctttatcccaggtctgatagga tgcttgcgagggcacctgccggctcgtagaccataggac
51	BVDV1	gtatagagaatttgcctaggacctgtttacaatatgggcaatctaaaattataattagg cctaagggacaaatcctcctcagcgaaggccgaaaagggtagccatgcccttagt aggactagcaaaataagggggttagcaacagtgtgtgagttcgttggatggctgaag ccctgagtacagggtagtcgtcagtggttcgacgttcggaggacaagcctcgagat accacgtggacgagggtcatgccacagcacatcttaacctggacgggggtcgttca gggtgaaaacgggttaaccaaccgtacgaatacagcctgatagggtgctgcagaggc ccactgtattgctactgaaaatctctgtgtacatggcac
52	ボーダー病 ウイルス	gtatcgggagtagtcatgccgtatacaaaattggatattccaaaactcgattgggtt agggagccctcctagcgacggccgaaccgtgttaaccatacacgtataggactag cagacgggaggactagccatcgtgtgtgagatccctgagcagtctaaatcctgagtac aggatagtcgtcagtagttcaacgcaggcacgggttcgttgccttgagatgtacgtggac gagggtcatgcccagacttgccttaatctggcgggggtcggcagggtgaaaacac ctaacgggtgtgggttacagcctgatagggtgtgcagaggccacgaataggcta

10

20

30

40

50

		gtataaaaatctctgctgtacatggcac
53	BVDV2	gtatacagagattagctaaagtactcgtatatggattggacgtcaacaaatttttaattggc aacgtagggaaacctccccctcagcgaaggccgaaaaggctagccatgccctttag taggactagcaaaagttaggggactagcggtagcagtgagttcgttgatggccga acctctgagtacaggggagtcgtcaatggttcgacactccattagtcgaggagtctcg agatgccatgtggacgaggcatgccacggcacatcttaacccatgcgggggttg catgggtgaaagcgctaactgtggcggttatggacacagcctgtaggggtgtagcaga gacctgctattccgctagtaaaaaactctgctgtacatggcac
54	CSFV- PK15C	gtatacagaggttagttcattctcgtatgcattattggacaaatcaaaatttcaatttggttca gggcctccctccagcgacggccgaactgggctagccatgccatagtaggactagc aaacggagggactagccgtagtggcgagctccctgggtgttctaagtcctgagtaca ggacagtcgtcagtagttcgacgtgagcagaagcccacctcgagatgctatgtggac gagggcattgcccagacgcacctaaccctagcgggggtcgtaggggtgaaatcac accacgtgatgggagtcgacctgatagggtgctgcagaggctcactattaggctagt ataaaaatctctgctgtacatggcac
55	SF573 ジシストロ ウイルス	aaaaccgacccagagatcagaagtcgttgacgcgatcttttattagaggacgttgc gctggcgcgagctttaaattagcagacgcaaaaaataacaacaaatgctgatcgcg agacttaattgtagacgattggccaaatccgatgtgatctttgctgctccagattgcc gaaataggagtagtag
56	湖北 ピコルナ様 ウイルス	ccccaaaaccccccttaactcaacactgtagtggattcattttccgttgcaaaacaa aacattactacccgcaattatgtaggctctgtgtttctatgcgaccgttacattaatctcta ctctgaccactagtttataaaaccgaagacctgaatgaaacgattttctcttttcaac ctctaacgaacctctgacggcttgagaaacctgaagttagtaattatgtttaaagaaaag gaaagtcacacgcgatgactcttacatccctattccataccgttgctccacaatgtgag cgatgcgaggtcgggactgcagtagtaggggaacgagctacatggagagttaattat ctctccctctacgggagtcctcatgtgagctgtagaaagcgggttgccacctctcgfta cctcgctgtacatgatcc
57	CRPV	aaaagcaaaaatgtgatcttgcgtgtaaatacaattttgagaggtaataaattacaagta gtgctattttgtatttaggttagctatttagctttacgttccaggatgcctagtgccagccc cacaatatccagggaagccctctcgcggttttcagattaggtagtcgaaaaacctaaag aaatttacct
58	サリウイルスA BN5	tttctcctttcgaccgccttacggcaggcgggtccgcggacggcttcggcctaccgg cgacaagaatgccgtcatctgtccttaccatattctttcccttccccgcaacctc acgcttactcgcgcacgtgttgagtgacgtgcgttgccaacagttacactcacac ccttggggcgggtttgtcccgcctcgggttctcgcggaaacctccctctctctcc ctttctatccgcttcaactttccataactacagtgtttgtaggtgaagcatcctgacccc ccgcggaagtgccaacgtggcaactgtgggatccaggcaggttatcaaaggcac ccggtctttccgcttcaggagtagctccctgccggtgaattccgacagggtctgttgg tgccaacctcccccaaatgcgcgctgcgggagtgctcttccccaaactatcttagtaac ctctcatgtgtgtgcttggtcagcatatctgagggacgttccgctgtcccagaccagt ccagcaatggacgggccagtgtagtagtcgcttccggtttccggcgcatgtttgg cgaaacgtgaggtgaaggttggtgtgccaatgccgtaatttggtagacctcaaga ccaccaggaatgccaggaggtacccacttcggtgggatctgacctgggctaatt tgtctacgggtgttcttcttcttccacttctctttttctggcatg
59	サリウイルスA BN2	tatggcagcggggtgttgacggcttcggcccacccacagcaagaatgccatcatc tgtctcaccctcatttcccttcttccctgcaaccgttacgttactcgcaggtgc atttgagtggtgcacgtgtgaataaacagctacactcacatggggcgggtttcccg ccctgcggcctctcgcgagggccaccctcccttctccataactacagtgtttgg taggtaagcatcctgatcccccggaagctgctcacgtggcaactgtggggaccca

10

20

30

40

		gacaggttatcaaaaggcaccgggtcttccgccttcaggagtatccctgctagtgaatt ctagtagggctctgcttgggtccaacctcccccaaatgcgcgctgcgggagtgtctt ccccaaactcaccttagtatcctctcatgtgtgtgcttggtagcagatactgagacgatgt ccgctgtcccagaccagtcagtaatggacgggccagtgctgtagtcgttccgg ctttccggcgcagtgttgggtgaaccgggtgggtaagggttgggtgcccacgcccgt actttggtgatactcaagaccaccaggaatgccaggaggtacccccgttcacag cgggatctgaccctgggctaattgtctacgggtgttcttctgttccacttcttactgt tc	
60	サリウイルスA 02394	tttcgaccgccttatggcaggcgggcttggtagggcttcggcccaccacagcaag aatgccatcatctgtctcacccttcttccctccttccctgcaaccattacgctta ctcgcagtgtgcattgagtggtgcacgtgtgaacaaacagctacactacgtgggggc gggttttcccgccttcggcctctcgcgagggccacccttcccttctccataacta cagtgttggtagtaagcatcctgatccccgcggaagctgctcgcgtggaactg tggggacccagacaggttatcaaaaggcaccgggttcttccgcctccaggagtaccc gctagtgaattctagtggggtctgcttgggtccaacctcccccaaatgcgcgctgcg ggagtgtcttccccaaactaccctagtagtctctcatgtgtgtgcttggtagcagatact gagacgatgttccgctgtcccagaccagtcagcaatggacgggccagtgctgta gtcgtcttccggctgtccggcgcagtgttgggtgaaccgggtgggtaagggttgggtgc ccaacgcccgtacttgggtgacaactcaagaccaccaggaatgccaggagggtac cccgctcacggcggtatctgaccctgggctaattgtctacgggtgttcttctgttcc atttcttcttctgttc	10
61	サリウイルスA GUT	tatggcaggcgggcttggtaggggttccggcccaccacagcaagaatgccatcatc tgtctcaccctcaatttcccttcttccctgcaatcatcacgcttactcgcagtgtgcatt gagtgggtgcattgttgaacaaacagctacactcacatgggggcgggttttccggcc tacggcctctcgcgagggccacccttcccttcccttataactacagtgttggcagg taagcatcctgatccccgcggaagctgtcacgtggcaactgtggggaccagac aggttatcaaaaggcaccgggttcttccgccttcaggagcatccccactagtgaattcta gtggggctctgcttgggtgccaacctcccccaaatgcgcgctgcgggagtgtcttccc caaccatcctagtagtctctcatgtgtgtgcttggtagcagatactgagacgagttcc gctgtcccagaccagtcagtaaatggacgggccagtgctgtagtcgttccggctt gtccggcgcagtgttgggtgaaccgggtgggtaagggttgggtgcccacgcccgtact ttggtgacacctcaagaccaccaggaatgccaggagggtacccgcctcacggcg ggatctgaccctgggctaattgtctacgggtgttcttcttgcctccacttcttctt	20
62	サリウイルスA CH	tttctctgcaaccattacgcttaatgcagtgtgcattgagtgggtgcagtgttgaacaaac agctacaatcacatggggcgggttttccggcccacggcttctcgcgaggcccatc cctcccttttccataactacagtgttggtagtaagcatccgatctccgcgga agctgtcacgtggcaactgtggggaccagacaggttatcaaaaggcaccgggtctt tccgccttcaggagtatccctgctagcgaattctagtagggctctgcttgggtccaacct ctccccaatgcgcgctgcgggagtgtcttccccaaatcacccagtagtctctcatgt gtgtgcctggtagcagatactgagacgatgtccgctgtcccagaccagtcagtaaatg gacgggccagtgtgcgtagtcgtctccggcttgcggcgcagtgttgggtgaaccgg tggggtgaagggttgggtgcccacgcccgaatcagggggatactcaaggcaccga ggaatgccaggagggtatcccgcctcacaggggatctgaccctgggtaaatgtct gcgggggggtctcttggcccattctcagtaatttcagg	30
63	サリウイルスA SZ1	tctgtctcaccctatcttcccttcttctgcaccgttacgcttactcgcagtgtgcattga gtggtgcacgtgcttgaacaaacagctacactcacatgggggggggttttccggccct gcggcctctcgcgagggccacccttcccttccataactacagtgttggtag gtaagcatcctgatccccgcggaagctgtcacgtggcaactgtggggaccagga cagggttatcaaaaggcaccgggttcttccgccttcaggagtacccctgctagtgaattcta	40

		gtagggctctgcttgggtgccaacctcccccaaatgcgcgctgcgggagtgcttccc caactcacctagatctctcatgtgtgtcttgggtcagcatalctgagacgatgttccg ctgtcccagaccagtcagtaattgacgggagtggtcgtagtcgttccggttg tccggcgcattgttgggaaccgggtgggtaagggtggtgtgccaacgccgtactt tgggtatactcaagaccaccaggaatgccaggagggtaccccgcttcacagcgg gatctgacctgggctaattgtctacgggtgttcttcttcttccacttcttctactgttcat g	
64	サリウイルス FHB	acatggggggtctgcggacggcttcggcccaccgcgacaagaatgccgtcatctg tcctcattaccggtattcttcccttccccgcaaccaccacggtactcgcgcacgtgtt gagtggtcacgtgcgtgttccaaacagctacaccacacccctcggggcgggttctg ccgccctcgggttctcgcggaacccccctcctctctcttcttctatccgccctac tcccataactacagtcttggtaggtgagcacctgaccccccgaggaaagctgcta acgtggcaactgtgggatccaggcaggtatcaaaaggcacccggcttctccgcttc aggagtatctctccgggaattccggtagggctctgcttgggtgccaacctccccaa atgcgcgctgcgggagtgcttccccaaactcatcttagtaacctctcatgtgtgtctt ggtcagcatalctgaggcgacgttccgctgtccagaccagtcagcaatggacggg ccagtgtgcgtagtcgttccggttccggcgcattgttggcgaacgctgaggtaa ggttgggtggtgccaacgccgtaatttgggtgatactcaagaccaccaggaatgcca gggaggtaacccacttcgggtgggatctgacctgggctaattgtctacgggtgttcttc ttgcttccacttctcttcttcttctggcatg	10
65	CVB3	ttaaaacagcctgtgggtgatccaccacagggccattgggcgctagcactctggt atcacgggtaccttctgtgcgctgtttataccctcccccaactgtaactagaagtaac acacaccgatcaacagtcagcgtggcacaccagccacgtttgatcaagcacttctgtt accccgactgagtatcaatagactgtcacgcggttgaaggagaaagcgttcgttat ccggccaactacttcgaaaaacctagtaacaccgtggaagtgcagagtgttctgctc agcactacccagtgtagatcaggtcgtgatgtcaccgcattccccacggcgaccg tggcggtggctgcgttggcggcctgcccattggggaacccatgggacgctctaatac agacatggtgcgaagagtctattgagctagtgtgtagtctccggccccgtgaatgcgg ctaactctaactgcggagcacacacctcaagccagaggcaggtgtgtcgtaacgg gcaactctgcagcggaaaccgactacttgggtgtccgtgtttcattttatctatacttg ctgcttatgggtgacaattgagagatcgttaccatatagtattgattggccatccgggtg actaatagagctattatataatcccttgggttataaccacttagcttgaagagggttaa aacattacaattcattgttaagtgaatacagcaaa	20
66	CVB1	ttaaaacagcctgtgggtgttcccaccacagggccattgggcgctagcactctggt atcacgggtaccttctgtgcgctgtttatccctcccccaactgtaattagaagttca cacaccgatcattagcaagcgtggcacaccagccatgtttgatcaagcacttctgtta ccccggactgagtatcaatagaccgtaacgcggttgaaggagaaaacgttcgttac ccggccaactacttcgaaaaacctagtaacaccatggaagtgcggagtgttctgctc agcactacccagtgtagatcaggtcgtgatgtcaccgcgttccccacggcgacc gtggcggtggctgcgttggcggcctgcctacggggaacccgtaggacgctctaat acagacatggtgcgaagagtctattgagctagtgtgtaatctccggccccgtgaatgc ggctaactctaactgcggagcacataacctcaaacagggggagcagtggtcgtaacg ggcaactctgcagcggaaaccgactacttgggtgtccgtgttcttcttctatactg gctgcttatgggtgacaattgacaggtgttaccatatagtattgattggccatccgggtg actaacagagcaattatatactcttgggttataaccacttagcttgaagagggttaa aacactacatctcatcattaaactaaatacaaaaa	30
67	エコーウイルス 7	ttaaaacagcctgtgggtgttcccaccacagggccattgggcgctagcaccctgg tatcacgggtaccttctgtgcgctgtttatccctcccccaactgtaactagaagaac acacaccgatcaacagcaagcgtggcacaccagccatgtttgtcaagcacttctgt	40

		taccccgactgagtatcaatagactgctcacgcggtgaaggagaaagcgctcgtta tccggccagctacttcgagaaacctagtaacacatggaagttgaggagtgttcgct cagcactacccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcttccccacggcgacc gtggcggtggctgcgttggcggcctgacctatgggggaacccataggacgcttaata cagacatggtgcgaagagctattgagctagctgttattcctccggccctgaatgcg gctaafctaaactgtggagcacatgccctaatacgaagggtagtgctgtaatgag caattccgcagcgggaaccgactactttgggtgtccgtgttctcttattctgtactggct gcttatggtgacaattgagagattgtaccatatagctattggattggccatccggtgact aatagagctattgttatctcttggattgtaccacttaattgaaagaaatcaggac actacgctacatttactattgaacaccgcaaa	
68	CVB5	ttaaaccagcctgtgggtgtaccacccacagggcccactggcgctagcactctg gtatcacggtacctttgtgcgctgtttatgccccctcccccaattgaaacttagaagt acacacaccgatcaaacagcggcggtggcataccagccgcgtctgatcaagcactc ctgttccccggaccgagtatcaatagactgctcacgcggtgaaggagaaaacgttc gttaccgggctaactacttcgagaaacctagtagcatcatgaaagttgcgaagcgttcc gctcagcacatccccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgattccccacggcg accgtggcggtggctgcgttggcggcctgcctacggggaacccgtaggacgcttc aatacagacatggtgcgaagagtcgattgagctagttagtctccggccctgaa tccggctaactcctaactgcggagcacataccctcaacccagggggcattgtgtgtaa cgggtaactctgcagcgggaaccgactactttgggtgtccgtgttctcttattctataat ggctgcttatggtgacaattgaaagattgtaccatatagctattggattggccatccggt gtctaacagagctattatataacctcttggattgtaccactgatctaagggaagtc agacactacaattcatcatacaattgaacacagcaaa	10 20
69	EVA71	ttaaaccagcctgtgggtgtaccacccacagggcccactggcgcaagcactctg gcacttcggtacctttgtgcgctgtttatataccccctcccccaatgaaatttagaagcag caaacccgatcaatagcaggcataacgctccagttagtcttgatcaagcacttctgtt tccccggactgagtatcaatagactgctcacgcggtgaaggagaaaacgttcgttat ccgggtaactacttcgaaagcctagtaacacatggaagttgcggagagtttcgttc agcacttccccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgattccccacggcgaccg tggcggtggctgcgttggcggcctgcccaggggtaacccatgggacgctctaatac ggacatggtgtgaagagctactgagctagttagtagtccctccggcccctgaatgcgg ctaataccaactgcggagcacacgcccacaagccagtggttagtgctgtaacgg gcaactctgcagcgggaaccgactactttgggtgtccgtgttctcttattcttatgttgc tgcttatggtgacaattaaagagttgtaccatatagctattggattggccatccggtgtg caacagagcgatcgtttacctatttattgtttgtaccattgacactgaagtctgtgatca cccttaattttatcttaacccctcaacacagccaaac	30
70	CVA3	ttaaaccagcctgtgggtgtaccacccacagggcccactggcgctagcacactg gtattacggtacctttgtgcgctgtttatatacccccccaacctcgaacttagaagtaa agcaaaccgatcaatagcagggtgcggcgaccagtcgcatcttgatcaagcacttct gtaaccccgaccgagtatcaatagactgctcacgcggtgaaggagaaaacgttcg ttaccgggctaactacttcgagaaaccagtagcatcatgaaagttgcagagtgttccg ctcagcactaccccggtgtagatcagggcgatgagtcaccgacttccccacggcg accgtggcggtggctgcgttggcggcctgcctatggggaacccataggacgctcta atacggacatggtgcgaagagctattgagctagttagtctccggccctgaatg cggctaactcctaactgcggagcacatacccttaatacgaaggcgagtgtgtaacg ggtaactctgcagcgggaaccgactactttgggtgtccgtgttctcttattttactggc tgcttatggtgacaattgaggaattgtgccatatagctattggattggccatccggtga ctaacagagctattgttccaattgttgatttaccctcgcacactcacagtcgtaag aaccttcattacgtgttattctcaactcaagaaa	40

71	CVA12	ttaaaacagcctgtgggtgtacccacccacagggcccactgggcgctagcactctg gtactacgggtacctttgtgcctgttttaagcccctacccccactcgttaacttagaag gcttctcacactcgatcaatagtaggtgtggcacgccagtcacaccgtgatcaagcac ttctgttaccgggtctgagtaccaataagctgctaacgcggctgaaggggaaaacga tcgttatccggctaactacttcgagaaaccagtagccaccatgaacgttgagggtgtt tcgctcggcacaacccagtagatcaggtcgatgagtcaccgtattccccacggg cgaccgtggcgggtggctgcgttggcggcctgccatgggggtgacccatgggacgt ctaatactgacatgggtgcgaagagtctattgagctagttagtagtcccgcccctga atgcggctaatacctaactgcggagcacatacccttaatacgaagggcagtggtcgt acgggcaactctgcagcgggaaccgactactttgggtgtccgtgttccctttattcttaca ttggctgcttatggtgacaattgaaaagttgttaccatagctattggattggccatccg gtgacaaaatagagctattgtatatttttgggttacgtaccccttaattacaaagtgtt tcaactttgaaatacatcctaactaaattgtagaaa	10
72	EV24	ttaaaacagcctgtgggtgcacccacccacagggcccacagggcgctagcactctg gtatcacgggtacctttgtgcctgttttattacccctccccaattgaaaattagaagca atgcacaccgatcaacagcaggcgtggcgacccagtcacgtcgcgatcaagcacttc tgttccccggaccgagtatcaatagactgtcacgcggtgaaggagaaagtgttcgt tatccggctaaccacttcgagaaaccagtaacaccatgaaagttgcagggtgttcg ctacgacttccccagtagatcaggtcgatgagtcaccgcgttccccacgggcga ccgtggcgggtggctgcgttggcggcctgcctatgggttaaccataggacgctctaat acagacatgggtgcgaagagttattgagctggttagtatccctccggcccctgaatgcg gctaatacctaactgcggagcacgtgcctccaatccagggggtgcatgtcgtaacgg gtaactctgcagcgggaaccgactactttgggtgtccgtgttccctttattcttatactggc tgcttatggtgacaatcgaggaattgttaccatagctattggattggccatccgggtgc taacagagcgattatatacctcttgggtgatttatgcagctcaataccaccaacttaaca cattgaaatatactttaaagttaaacacagcaaa	20

【0326】

一部の実施形態では、本発明のIRESは、表3に列挙された配列（配列番号1～72）を有するIRESである。一部の実施形態では、IRESは、サリウイルスIRESである。一部の実施形態では、IRESは、サリウイルスSZ1 IRESである。

【0327】

（表4）アナベナ順列置換部位5'イントロンフラグメント配列。

配列番号	順列置換 部位	配列
73	L2-1	GAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGG GAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTG AGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAT AGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAA AGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTA GCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
74	L2-2	AAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGG AAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGA GCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATA GATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTC GACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAA

		GAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAG CGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
75	L2-3	AGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGA AACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGC CAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGA TGACTIONAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGA CGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCG AAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
76	L5-1	GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGT AGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAAC AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCC TAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGT
77	L5-2	TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTA GTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAAC ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCC AACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAG AATGAAAATCCGT
78	L5-3	TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAAC TCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCC ACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGA ATGAAAATCCGT
79	L5-4	ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGT AATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAAC CGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCC CGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT AAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGT
80	L5-5	TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTA ATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAAC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCC GTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT AAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA GAAAATCCGT
81	L6-1	ACAATAGATGACTTACAACATAATCGGAAGGTGCAG AGACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAG GGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGG CAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
82	L6-2	CAATAGATGACTTACAACATAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGC AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
83	L6-3	AATAGATGACTTACAACATAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGG

10

20

30

40

50

		TAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
84	L6-4	ATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGA CTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAG TAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
85	L6-5	TAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGAC TCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTA AAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGT AGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
86	L6-6	AGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAA AGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTA GCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
87	L6-7	GATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTC GACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAA GAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAG CGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
88	L6-8	ATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCG ACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAG AGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGC GAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
89	L6-9	TGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGA CGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCG AAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
90	L8-1	CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAA GCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGT
91	L8-2	AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAG CCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAA AATCCGT
92	L8-3	AGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAA ATCCGT
93	L8-4	GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCC AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAA TCCGT
94	L8-5	ACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAAT CCGT
95	L9a-1	AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAA TCCGT
96	L9a-2	ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAAT CCGT
97	L9a-3	TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATC CGT
98	L9a-4	AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCC GT

10

20

30

40

50

99	L9a-5	GGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT T
100	L9-1	GAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
101	L9-2	AAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
102	L9-3	AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
103	L9-4	AGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
104	L9-5	GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
105	L9-6	CTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
106	L9-7	AAGAGAATGAAAATCCGT
107	L9-8	AGAGAATGAAAATCCGT
108	L9-9	GAGAATGAAAATCCGT
109	L9a-6	GCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
110	L9a-7	AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
111	L9a-8	GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT

10

【0328】

一部の実施形態では、5'イントロンフラグメントは、表4に列挙された配列を有するフラグメントである。典型的には、表4に列挙された5'イントロンフラグメントを含有するコンストラクトは、表5に列挙されるような対応する3'イントロンフラグメントを含有するだろう（例えば、両方ともL9a-8順列置換部位を伴うフラグメントを表す）。

20

【0329】

（表5）アナベナ順列置換部位3'イントロンフラグメント配列。

配列番号	順列置換部位	配列
112	L2-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAA
113	L2-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAG
114	L2-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGA
115	L5-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTA
116	L5-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAG
117	L5-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGT
118	L5-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTT
119	L5-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTA
120	L6-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTA
121	L6-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT

30

40

50

		CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAA
122	L6-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAAC
123	L6-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACA
124	L6-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACA
125	L6-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAT
126	L6-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATA
127	L6-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAG
128	L6-9	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGA
129	L8-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGT
130	L8-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTC
131	L8-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCA

10

20

30

40

50

132	L8-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAA
133	L8-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAG
134	L9a-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCC
135	L9a-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCA
136	L9a-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAA
137	L9a-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAAT
138	L9a-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATA
139	L9-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA

10

20

30

40

50

		ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGC	
140	L9-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCG	10
141	L9-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGA	
142	L9-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAA	20
143	L9-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAA	
144	L9-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAG	30
145	L9-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTG C	
146	L9-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT	40

		CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTG CA	
147	L9-9	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTG CAA	10
148	L9a-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAG	20
149	L9a-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGC	
150	L9a-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCA	30

【0330】

一部の実施形態では、3'イントロンフラグメントは、表5に列挙された配列を有するフラグメントである。一部の実施形態では、表5に列挙された3'イントロンフラグメントを含有するコンストラクトは、表4に列挙されるような対応する5'イントロンフラグメントを含有するだろう（例えば、両方ともL9a-8順列置換部位を伴うフラグメントを表す）。

【0331】

（表6）非アナベナ順列置換部位5'イントロンフラグメント配列。

10

20

30

40

50

配列番号	イントロン	配列
151	Azop1	tgcgccgatgaaggtgtagagactagacggcacccacctaaggcaaacgctatggtgaaggcatagtcaggaggagtgccgaaagtcacacaaaccggaatccgt
152	Azop2	ccgggcgtatggcaacgccgagccaagcttcggcgccctgcgccgatgaaggtgtagagactagacggcacccacctaaggcaaacgctatggtgaaggcatagtcaggaggagtgccgaaagtcacacaaaccggaatccgt
153	Azop3	acggcacccacctaaggcaaacgctatggtgaaggcatagtcaggaggagtgccgaagtcacacaaaccggaatccgt
154	Azop4	acgctatggtgaaggcatagtcaggaggagtgccgaaagtcacacaaaccggaatccgt
155	S795p1	attaaagttatagaattatcagagaatgatatagtccaagccttatggtaacatgagggcacttgaccctggtag
156	Twortp1	aagatgtaggcaatcctgagctaagctcttagtaataagagaaagtgcacgactatccgatatggaagtaggggtcaagtgactcgaaatggggattacccttctagggtagtgatagtagtctgaacatatatggaaacatatagaaggataggagtaacgaacctattcgttaacataattgaacttttagttat
157	Twortp2	taataagagaaagtgcacgactattccgatatggaagtaggggtcaagtgactcgaaatggggattacccttctagggtagtgatatagtctgaacatatatggaaacatatagaaggataggagtaacgaacctattcgttaacataattgaacttttagttat
158	Twortp3	taggaagtaggggtcaagtgactcgaaatggggattacccttctagggtagtgatatagtctgaacatatatggaaacatatagaaggataggagtaacgaacctattcgttaacataattgaacttttagttat
159	Twortp4	ctagggtagtgatatagtctgaacatatatggaaacatatagaaggataggagtaacgaacctattcgttaacataattgaacttttagttat
160	LSUp1	agttaataaagatgatgaaatagtctgaaccattttgagaaaagtggaaataaaagaaatcttttatgataacataaattgaacaggctaa
161	Phip1	caaagactgatgatatagtccgacactcctagtaataggagaatacagaaaggatgaaatcc
162	ノストック	agtcgagggttaaaggagagtgccaattctcaaagcctattggcagtagcgaaagctgcgggagaaatgaaaatccgt
163	ノストック	agccgagggttaaaggagagtgccaattctcaaagccaataggcagtagcgaaagctgcgggagaaatgaaaatccgt
164	ノジュラリア	agccgagggttaaaggagagtgccaattctcaaagccaaggtattataaacctggcagcagtgaaagctgcgggagaaatgaaaatccgt
165	プルロカプサ	agctgagggttaaagagagagtgccaattctcaaagccagcagatggcagtagcgaaagctgcgggagaaatgaaaatccgt
166	プランクスリックス	agccgagggttaaagagagagtgccaattctcaaagccaattggtagtagcgaaagctgcgggagaaatgaaaatccgt

10

20

30

【0332】

一部の実施形態では、5'イントロンフラグメントは、表6に列挙された配列を有するフラグメントである。表6に列挙された5'イントロンフラグメントを含有するコンストラクトは、表7に列挙されるような対応する3'イントロンフラグメントを含有するだろう（例えば、両方ともAzop1イントロンを伴うフラグメントを表す）。

【0333】

（表7）非アナベナ順列置換部位3'イントロンフラグメント配列。

40

50

配列番号	イントロン	配列
167	Azop1	gcggactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaaccacgcaagggatggtgtcaa attcggcgaaacctaagcgcccgccgggcgtatggcaacgccgagccaagcttcg gcgcc
168	Azop2	gcggactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaaccacgcaagggatggtgtcaa

		attcggcgaaacctaagcgcccg
169	Azop3	gcggactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaaccacgcaagggatggtgtcaa attcggcgaaacctaagcgcccgccgggcgtatggcaacgccgagccaagcttcg gcgcctgcgccgatgaaggtgtagagactag
170	Azop4	gcggactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaaccacgcaagggatggtgtcaa attcggcgaaacctaagcgcccgccgggcgtatggcaacgccgagccaagcttcg gcgcctgcgccgatgaaggtgtagagactagacggcaccacctaaggcaa
171	S795p1	aggattagatactacactaagtgtccccagactggtgacagtctggtgtgcatccag ctatatacgtgaaacccattggggtaataccgagggaagctatattatataat aaatagccccgtagagactatgaggaaggagatagaagatgataaaatcaaatca tc
172	Twortp1	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaattgtatcgaataatcctcta tcagggaacacctaacaact
173	Twortp2	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaattgtatcgaataatcctcta tcagggaacacctaacaactaagatgtaggcaatcctgagctaagctcttag
174	Twortp3	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaattgtatcgaataatcctcta tcagggaacacctaacaactaagatgtaggcaatcctgagctaagctcttagtaata agagaagtgcacgactattccga
175	Twortp4	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaattgtatcgaataatcctcta tcagggaacacctaacaactaagatgtaggcaatcctgagctaagctcttagtaata agagaagtgcacgactattccgatagggaaggtagggtcaagtgcacgaatggg gattaccctt
176	LSUp1	cgtagggtatataactgtgagtcctcaataattataaaatgttggaatattgggtgaa atttcaagacaacttttccacgtcaggatatagtgtattgaagcgaactatttttag cagtgaaaaagcaataaggacgttcaacgactaaaaggtagtattgctaacaataa tcctttttttaaagcccaacatctttattaact
177	Phip1	gtgggtgcataaactatttcattgtgcacattaaatctggtgaactcgggtgaacccaat ggggcaataccgagccaagccataggaggatataatgagagcgaagaagttaattct tgaggccactgagactgggtgtatcatccctacgtcacacaaacttaagccgatggtt atttcagaaagaaaacaaatggcgtcttagagatgtatcacagaacgggtgtggaagga gcataacggagacatacctgatggcttcgagatagaccataagtgtcgaatagggtc tgtgtatataagacatttacagatgcttgagggtacagcccacactgttaagaccaa tcgtgaacgctacgcagacagaaaggaacagctagggaatactggctggagactg gatgtaccggcctagcactcggtagaagtttgggtgtcgttctctctgctgttaagt gattagagaatggaaggcgtagagactatccgaaaggagtagggccgagggtgag actccctcgtaacccgaagcgccagacagtcaact
178	ノストック	acggacttaagttaattgagccttaagaagaattcttaagtggcagctctcaactca gggaaacctaatactgttcacagacaaggcaatcctgagccaagccgaaagagtc gagtgtgtagttagtgaataaataaagctcacaactcagagggtgtaactctaagcta gtcgggaagggtgcagagactcgacgggagctaccctaacgtaa
179	ノストック	acggacttaagttaattgagccttagagaagaattcttaagtgtcagctctcaact cagggaacctaatactgttgacagacaaggcaatcctgagccaagccgagaactct aagttattcgggaagggtgcagagactcgacgggagctaccctaacgtca
180	ノジュリア	acggacttagaaaactgagccttgatcgagaaatcttcaagtggaaagctctcaattc agggaaacctaatactgtttacagatatggcaatcctgagccaagccgaaacaagtcc tgagtgttaaagctcataactcatcggaagggtgcagagactcgacgggagctacccta acgtta
181	プルロカプサ	acggacttaaaaaaattgagccttggcagagaatctgtcatgcgaacgctctcaatt cagggaacctaagtctggcaacagatatggcaatcctgagccaagccctaataacg

10

20

30

40

50

		gaaaaaacatttttaccttttaccttgaaaggaaggtgcagagactcaacgggagctaccctaacagggtca
182	プランクスリックス	acggacttaaaagataaaattgagccttgaggcgagaaatctctcaagtgtaaagctgtcaaatcagggaacctaataatctgtaaattcagacaaggcaatcctgagccaagcctagggtattagaaatgaggaggtttccccaatctaagatcaatacctaggaaggtgcagagactcgacgggagctaccctaacgtta

【0334】

一部の実施形態では、3'イントロンフラグメントは、表7に列挙された配列を有するフラグメントである。表7に列挙された3'イントロンフラグメントを含有するコンストラクトは、表6に列挙されるような対応する5'イントロンフラグメントを含有するだろう（例えば、両方ともAzo p1イントロンを伴うフラグメントを表す）。

【0335】

（表8）スパーサー及びアナベア5'イントロンフラグメント配列。

配列番号	スパーサー	配列
183	T25 L10	agtataaagaacaaaccacTAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAA AATCCGTggctcgagc
184	T25 L20	ctgaaattatacttatactcaaacaaaccacTAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAG AATGAAAATCCGTggctcgagc
185	T25 L30 (I80-10) [対照]	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
186	T25 L40	catcaacaatatgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
187	T25 L50	catcaacaatatgaaactatacttatactcagtatatgaagcattatcgcaacaaacca cTAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
188	T50 L10	tagcgtcagcaaacaaacaaaTAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
189	T50 L20	atactcatactagcgtcagcaaacaaacaaaTAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCT

10

20

30

40

50

		AACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAG AATGAAAATCCGTggctcgcagc
190	T50 L30	gtgtgaagctatactcatactagctcagcaaacacaaaTAGATGACTT ACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAG CTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGT CCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
191	T50 L40	cctcacctgagtgtagaagctatactcatactagctcagcaaacacaaaTAGA TGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGA CGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCG AAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
192	T50 L50	ccgaatgatgctcacctgagtgtagaagctatactcatactagctcagcaaacac aaaTAGATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGG TAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctc gcagc
193	T75 L10	cgggtgcgagcaaacacaaaTAGATGACTTACAACTAATCGG AAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAA GCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTggctcgcagc
194	T75 L20	cgctccgacccagtgcgagcaaacacaaaTAGATGACTTACAACT AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCC TAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGTggctcgcagc
195	T25 L30 1MM	ctgaaattatactAatactcagtatatgacaaacaaccacTAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
196	T25 L30 3MM	ctgaaaAtatactAatactcaCtatatgacaaacaaccacTAGATGACTT ACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAG CTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGT CCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
197	T25 L30 5MM	ctgaTaAtataGtAatactcaCtatatgacaaacaaccacTAGATGACT TACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGA GCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAG TCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
198	T25 L30 8MM	ctgaTaAtaAaGtAatacAcaCtataAgacaaacaaccacTAGATGA CTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGG GAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAA GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc

10

20

30

40

50

199	T25 L30 オフターゲット 10	ctgaaattatacttatactctctaagttacaacaaccacTAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCT ACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
200	T25 L30 オフターゲット 20	ctgaaattatgtgtgttacAtctaagttacaacaaccacTAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
201	T25 L30 オフターゲット 30	gttgatcgggtgtgtgttacAtctaagttacaacaaccacTAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
202	T25 L30 I25-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCT ACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTgattaaacag
203	T25 L30 I25-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCT ACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTgattcacaataataattacg
204	T25 L30 I50-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCT ACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggatcatagc
205	T25 L30 I50-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCT ACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggatcgcagcataatccg
206	T25 L30 I80-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCT ACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagcgcgcctaccg
207	T25 L30 I80-20x2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCT ACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagcgcgcctaccgaaagcc ggcgtcgacgttagcgc
208	T25 L30 I50-20x2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCT ACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC

10

20

30

40

50

		AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggatcgagcataatatccgaacgag gatacaagtgcacatgc
209	T25 L30 I25-20x2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacTAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCT ACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTgattcacaatctaattacgaaacgataa atgataactctaac
210	T0 L0	aaacaaaccacTAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGAC GAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCC GTggctcgagc
211	T100 L5	cgggcaacaacaaaTAGATGACTTACAATAATCGGAAG GTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAA GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCC AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAA TCCGTggctcgagc
212	T75 L30	cgctccgagcagcttcggccagtgcgagcaacaacaaaTAGATGACT TACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGA GCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAG TCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
213	T0 L0a	aaacaaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTggctcgagc
214	T25 L10a	agtatataagaaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGTggctcgagc
215	T25 L20a	ctgaaattatacttatactcaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
216	T25 L30a (I80-10) [対照]	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
217	T50 L10a	tagcgtcagcaacaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGTggctcgagc
218	T50 L20a	atactcatactagcgtcagcaacaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
219	T50 L30a	gtgtgaagctatactcatactagcgtcagcaacaacaaaGGCAGTAGCG AAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
220	T75 L10a	cgggtcgagcaacaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAG AGAATGAAAATCCGTggctcgagc
221	T75 L20a	cgctccgacccagtgcgagcaacaacaaaGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
222	T75 L30a	cgctccgagcagcttcggccagtgcgagcaacaacaaaGGCAGTAGC GAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
223	T0 L0b	aaacaaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGTggctcgagc
224	T25 L10b	agtatataagaaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGT

10

20

30

40

50

		CCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
225	T25 L20b	ctgaaattatacttatactcaaaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
226	T25 L30b (I80-10) [対照]	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAG TAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgc agc
227	T50 L10b	tagcgtcagcaaaacaacaaaAAGACGAGGGTAAAGAGAGAG TCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
228	T50 L20b	atactcatactagcgtcagcaaaacaacaaaAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCG AAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
229	T50 L30b	gtgtgaagctatactcatactagcgtcagcaaaacaacaaaAAGACGAGGG TAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctc gcagc
230	T75 L10b	cgggtgcgagcaaaacaacaaaAAGACGAGGGTAAAGAGAGAG TCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
231	T75 L20b	cgctccgacccagtcgagcaaaacaacaaaAAGACGAGGGTAAAG AGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGC GAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
232	T75 L30b	cgctccgacgagctccgagcaaaacaacaaaAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGC AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggc tcgcagc
233	T25 L30 I0- 0	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacTAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCT ACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGT
234	T25 L30a I0-0	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
235	T25 L30a I25-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgattaaacag
236	T25 L30a I25-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgattcacaatataaatta cg
237	T25 L30a I50-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcatagc
238	T25 L30a I50-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcgagcataatat ccg
239	T25 L30a I80-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagcgcgct accg

10

20

30

40

50

240	T25 L30b I0-0	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAG TAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
241	T25 L30b I25-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAG TAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgattaaa cag
242	T25 L30b I25-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAG TAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgattcac aatataaattacg
243	T25 L30b I50-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAG TAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcat agc
244	T25 L30b I50-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAG TAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcgc agcataatatccg
245	T25 L30b I80-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAG TAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgc agcgcgcctaccg

10

20

【 0 3 3 6 】

一部の実施形態では、スペーサー及び5'イントロンフラグメントは、表8に列挙されるような配列を有するスペーサー及びフラグメントである。

【 0 3 3 7 】

(表9) スペーサー及びアナベア3'イントロンフラグメント配列。

配列番号	スペーサー	配列
246	T25 L10	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacaca caacttatatact
247	T25 L20	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacaca caagagtataagtataatttcag
248	T25 L30 (I80-10) [対照]	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacaca caagtcataatactgagtataagtataatttcag
249	T25 L40	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacaca

30

40

50

		caagtcataactgagtataagtataattcatattgttgatg
250	T25 L50	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAaacaaca caagcgataatgcttcataactgagtataagtatagttcatattgttgatg
251	T50 L10	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAaacaacaaa caagctgacgcta
252	T50 L20	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAaacaacaaa caagctgacgctagtagtat
253	T50 L30	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAaacaacaaa caagctgacgctagtagtatgagtatagcttcacac
254	T50 L40	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAaacaacaaa caagctgacgctagtagtatgagtatagcttcacactcaggtgagg
255	T50 L50	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAaacaacaaa caagctgacgctagtagtatgagtatagcttcacactcaggtgaggcatcattcgg
256	T75 L10	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAaacaacaaa caagctcgacagg
257	T75 L20	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAaacaacaaa caagctcgactgggtcggagcg
258	T25 L30 1MM	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAaacaaca caagtcataactgagtataagtataattcag
259	T25 L30 3MM	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC

10

20

30

40

50

		AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcatactaggtataagtataatttcag
260	T25 5MM	L30 gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcatactaggtataagtataatttcag
261	T25 8MM	L30 gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcatactaggtataagtataatttcag
262	T25 オフターゲット 10	L30 gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtaacttagagagtataagtataatttcag
263	T25 オフターゲット 20	L30 gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtaacttagaTgtaacacacataatttcag
264	T25 オフターゲット 30	L30 gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtaacttagaTgtaacacacaccgatcaac
265	T25 I25-10	L30 ctgtttaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAG AAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAA CCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCA AGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacacaagtcatactaggtataagtataatttcag
266	T25 I25-20	L30 cgtaatttatattgtgaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAA AGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAG GGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCT GAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAc acaaacacaagtcatactaggtataagtataatttcag
267	T25 I50-10	L30 gctatgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcatactaggtataagtataatttcag
268	T25 I50-20	L30 cggatattatgctgcgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTA AAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCA GGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCC TGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAA Acacaaacacaagtcatactaggtataagtataatttcag
269	T25 I80-20	L30 cggtaggcgcgctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTT AAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTC

10

20

30

40

50

		AGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATC CTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAAC AAcacaacacaagtcatactactgagtataagtataatttcag
270	T25 L30 I80-20x2	gcgctaacgtcgacgccggcaaacggtaggcgcgctgcgagccACGGACT TAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGT GGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGT AATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcatactactgagtataagt ataatttcag
271	T25 L30 I50-20x2	gcatgtcactgtatcctcgaacggatattatgctgcgatccACGGACTTAA ATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGAT TGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAAT TAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcatactactgagtataagtataatt tcag
272	T25 L30 I25-20x2	gttagagttatcatttatcgaaacgtaatttagattgtgaatcACGGACTTAA TAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGAT GCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAG ACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcatactactgagtataagtataatt cag
273	T0 L0	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacaca caa
274	T100 L5	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAaacaacaaa caagcccg
275	T75 L30	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAaacaacaaa caagctcgactggccggaagctcgtcggagcg
276	T0 L0a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaa
277	T25 L10a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAG

10

20

30

40

50

		AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaaacacaacttatatac t
278	T25 L20a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaaacacaagagtataa gtataatttcag
279	T25 L30a (180-10) [対照]	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaaacacaagtcata ctgagtataagataatttcag
280	T50 L10a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctgacg cta
281	T50 L20a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctgacg ctagtatgagtat
282	T50 L30a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctgacg ctagtatgagtatagcttcacac
283	T75 L10a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctcgca

10

20

30

40

50

		cgg
284	T75 L20a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctcgca ctgggtcggagcg
285	T75 L30a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctcgca ctggccggaagctcgtcggagcg
286	T0 L0b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTcacaacacaa
287	T25 L10b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTcacaacacaactatatact
288	T25 L20b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTcacaacacaagagtataagtataattca g
289	T25 L30b (180-10) [対照]	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTcacaacacaagtcataactgagtataa gtataatttcag
290	T50 L10b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTcaacaaaaacaagctgacgcta

10

20

30

40

50

291	T50 L20b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagctgacgctagtatgag tat
292	T50 L30b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagctgacgctagtatgag tatagcttcacac
293	T75 L10b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagctcgcaccg
294	T75 L20b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagctcgcactgggtcgga gcg
295	T75 L30b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagctcgcactggcggga agctcgtcggagcg
296	T25 L30 I0-0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAACacacaaacacaagtcata tactgagtataagtataatttcag
297	T25 L30a I0-0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAcacacaaacacaagtcataactgagtataa gtataatttcag
298	T25 L30a I25-10	ctgtttaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAG AAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAA

10

20

30

40

50

		CCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCA AGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATG ACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACG GGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGA GAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaagtcatact gagtataagtataatttcag
299	T25 L30a I25-20	cgtaatttatattgtgaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAA AGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAG GGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCT GAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAA TAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGAC TCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTA AAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacaca agtcatactgagtataagtataatttcag
300	T25 L30a I50-10	gctatgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaagtcatact ctgagtataagtataatttcag
301	T25 L30a I50-20	cggatattatgctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTA AAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCA GGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCC TGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACA ATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGA CTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacaca caagtcatactgagtataagtataatttcag
302	T25 L30a I80-20	cggtagcgcgctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTT AAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTC AGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATC CTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAAC AATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGG TAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaac acaagtcatactgagtataagtataatttcag
303	T25 L30b I0-0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCCacaacacaagtcatactgagtataagtataatttcag
304	T25 L30b I25-10	ctgtttaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAG AAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAA CCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCA AGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATG

10

20

30

40

50

		ACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACG GGAGCTACCCTAACGTCcacaacacaagtcataactgagtataagt ataatttcag	
305	T25 L30b I25-20	cgtaatttatattgtgaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAA AGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAG GGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCT GAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAA TAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGAC TCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaacacaagtcataact gagtataagtataatttcag	10
306	T25 L30b I50-10	gctatgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAATAGAT GACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCcacaacacaagtcataactgagtataa gtataatttcag	
307	T25 L30b I50-20	cggatattatgctgcgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTA AAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCA GGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCC TGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAA ATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGA CTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaacacaagtcata ctgagtataagtataatttcag	20
308	T25 L30b I80-20	cggtaggcgcgtgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTT AAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTC AGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATC CTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAAC AATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaacacaagtcata actgagtataagtataatttcag	30

【 0 3 3 8 】

一部の実施形態では、スペーサー及び3'イントロンフラグメントは、表9に列挙されるような配列を有するスペーサー及びイントロンフラグメントである。

【 0 3 3 9 】

(表10) C A R 配列。

配列番号	CAR	配列
309	FMC63-4-1BB	ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAG CTGCCCCATCCTGCCTTTCTGCTGATCCCCGACATCC AGATGACCCAGACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGC CTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGTAGAGCCAG CCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGC AAAAGCCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTAC CACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACAGCCT GACAATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATCGCTA CCTACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCTGCCTTACA CCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGC TCTACAAGCGGCAGCGGCAAACCTGGATCTGGCGA GGGATCTACCAAGGGCGAAGTGAACTGCAAGAGT CTGGCCCTGGACTGGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGA GCGTGACCTGTACAGTCAGCGGAGTGTCCCTGCCTG ATTACGGCGTGTCCTGGATCAGACAGCCTCCTCGGA AAGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGC GAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCG GCTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGG TGTTCCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGAC ACCGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTAC GGCGGCAGCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGG CACCAGCGTGACCGTTTCTTCTGCCGCCGCTATCGA AGTGATGTACCCTCCTCCTTACCTGGACAACGAGAA GTCCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGC ACCTGTGTCCCTTCTCCACTGTTCCCCGGACCTAGCA AGCCTTTCTGGGTGCTCGTTGTTGTTGGCGGCGTG TGGCCTGTTACAGCCTGCTGGTTACCGTGGCCTTCA TCATCTTTTGGGTCAAGAGAGGCCGGAAGAACTTC TTTATATATTCAAGCAGCCCTTTATGCGACCCGTTT AGACTACCCAAGAGGAAGATGGATGCAGTTGCCGC TTTCCAGAAGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAACTGtaa

10

20

30

40

50

310	FMC63- CD28	ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAG CTGCCCCATCCTGCCTTTCTGCTGATCCCCGACATCC AGATGACCCAGACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGC CTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGTAGAGCCAG CCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGC AAAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTAC CACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACAGCCT GACAATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATCGCTA CCTACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCTGCCTTACA CCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGC TCTACAAGCGGCAGCGGCAAACCTGGATCTGGCGA GGGATCTACCAAGGGCGAAGTGAACTGCAAGAGT CTGGCCCTGGACTGGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGA GCGTGACCTGTACAGTCAGCGGAGTGTCCCTGCCTG ATTACGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCTCCTCGGA AAGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGC GAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCG GCTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGG TGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGAC ACCGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTAC GCGCGCAGCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGG CACCAGCGTGACCGTTTCTTCTGCCGCCGCTATCGA AGTGATGTACCCTCCTCCTTACCTGGACAACGAGAA GTCCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGC ACCTGTGTCCTTCTCCACTGTTCCCCGGACCTAGCA AGCCTTTCTGGGTGCTCGTTGTTGTTGGCGGCGTGC TGGCCTGTTACAGCCTGCTGGTTACCGTGGCCTTCA TCATCTTTTGGGTCCGAAGCAAGCGGAGCCGGCTGC TGCACTCCGACTACATGAACATGACCCCTAGACGGC CCGGACCAACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCT CCTCCTAGAGACTTCGCCGCCTACCGGTCC_{taa}
-----	----------------	--

10

20

30

40

50

311	FMC63- CD28-ゼータ	ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAG CTGCCCCATCCTGCCTTTCTGCTGATCCCCGACATCC AGATGACCCAGACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGC CTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGTAGAGCCAG CCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGC AAAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTAC CACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACAGCCT GACAATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATCGCTA CCTACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCTGCCTTACA CCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGC TCTACAAGCGGCAGCGGCAAACCTGGATCTGGCGA GGGATCTACCAAGGGCGAAGTGAACTGCAAGAGT CTGGCCCTGGACTGGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGA GCGTGACCTGTACAGTCAGCGGAGTGTCCCTGCCTG ATTACGGCGTGTCTCTGGATCAGACAGCCTCCTCGGA AAGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGC GAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCG GCTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGG TGTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGAC ACCGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTAC GGCGGCAGCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGG CACCAGCGTGACCGTTTCTTCTGCCGCCGCTATCGA AGTGATGTACCTCCTCCTTACCTGGACAACGAGAA GTCCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGC ACCTGTGTCCTTCTCCACTGTTCCCCGGACCTAGCA AGCCTTTCTGGGTGCTCGTTGTTGTTGGCGGCGTGC TGGCCTGTTACAGCCTGCTGGTTACCGTGGCCTTCA TCATCTTTTGGGTCCGAAGCAAGCGGAGCCGGCTGC TGCACTCCGACTACATGAACATGACCCCTAGACGGC CCGGACCAACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCT CCTCCTAGAGACTTCGCCGCCTACCGGTCCAGAGTG AAGTTCAGCAGATCCGCCGATGCTCCCGCCTATCAG CAGGGCCAAAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCT GGGGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGC GGAGAGGCAGAGATCCTGAAATGGGCGGCAAGCCC AGACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGA GCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCG AGATCGGAATGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAA GGGACACGATGGACTGTACCAGGGACTGAGCACCG CCACCAAGGATACCTATGACGCCCTGCACATGCAG GCCCTGCCTCCAAGAtaa	10 20 30 40
-----	--------------------	---	---

312	FMC63- ゼータ	ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAG CTGCCCCATCCTGCCTTTCTGCTGATCCCCGACATCC AGATGACCCAGACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGC CTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGTAGAGCCAG CCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGC AAAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTAC CACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACAGCCT GACAATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATCGCTA CCTACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCTGCCTTACA CCTTTGGCGGAGGACCAAGCTGGAAATCACCGGC TCTACAAGCGGCAGCGGCAAACCTGGATCTGGCGA GGGATCTACCAAGGGCGAAGTGAACTGCAAGAGT CTGGCCCTGGACTGGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGA GCGTGACCTGTACAGTCAGCGGAGTGTCCCTGCCTG ATTACGGCGTGTCTCTGGATCAGACAGCCTCCTCGGA AAGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGC GAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCG GCTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGG TGTTCTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGAC ACCGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTAC GGCGGCAGCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGG CACCAGCGTGACCGTTTCTTCTGCCGCCGCTATCGA AGTGATGTACCCTCCTCCTTACCTGGACAACGAGAA GTCCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGC ACCTGTGTCTTCTCCACTGTTCCCCGGACCTAGCA AGCCTTTCTGGGTGCTCGTTGTTGTTGGCGGCGTGC TGGCCTGTTACAGCCTGCTGGTTACCGTGGCCTTCA TCATCTTTTGGGTCAGAGTGAAGTTCAGCAGATCCG CCGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGCCAAAACCAG CTGTACAACGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGA GTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGAGATC CTGAAATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAATCCT CAAGAGGGCCTGTATAATGAGCTGCAGAAAGACAA GATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGAATGAAGG GCGAGCGCAGAAGAGGCAAGGGACACGATGGACTG TACCAGGGACTGAGCACCGCCACCAAGGATACCTA TGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGAtaa
-----	---------------	--

10

20

30

40

50

313	Circ キムリア - Q388	ATGGCTCTCCCGGTCACAGCCCTTCTCCTGCCCTG GCACTCTTGCTGCATGCGGCACGACCCGACATCCAG ATGACCCAGACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTG GGCGATAGAGTGACCATCAGCTGTAGAGCCAGCCA GGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAAA AGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCAC ACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAAGCAGATT TTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACAGCCTGAC AATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATCGCTACCT ACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCTGCCTTACACCT TTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGTGGA GGTGGTTCTGGCGGAGGGGGATCTGGTGGAGGCGG TTCAGAAGTGAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACT GGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTAC AGTCAGCGGAGTGTCCCTGCCTGATTACGGCGTGTC CTGGATCAGACAGCCTCCTCGGAAAGGCCTGGAAT GGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACCTAC TACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATC AAGGACAACCTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGAT GAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACT ATTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACG CCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACC GTTCTTCTACCACAACGCCCCGCCCCGCGACCGCCT ACTCCCGCTCCCACAATTGCATCACAACCCCTGTCT TTGAGACCCGAAGCTTGTGCGACCAGCTGCCGGTGGC GCGGTTACACGCGGGGGCTCGATTTCGCCTGTGAT ATATATATATGGGCCCCATTGGCTGGAACATGCGGA GTATTGCTTCTGAGCCTGGTGATTACCCTCTACTGTA AGAGAGGCCGGAAGAACTTCTTTATATATTCAAGC AGCCCTTTATGCGACCCGTTTCAGACTACCCAAGAGG AAGATGGATGCAGTTGCCGCTTTCAGAAAGAGGAG GAGGGCGGGTGCGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAG ATCCGCCGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGGCCAAAA CCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAG AAGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGA GATCCTGAAATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAA TCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGAGCTGCAGAAAG ACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGAATG AAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAAGGGACACGATG GACTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACCAAGGAT ACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCA AGAtaa	10 20 30 40
-----	---------------------	---	---

314	Circ キムリア - K388	ATGGCTCTCCCGGTCACAGCCCTTCTCCTGCCCCTG GCACTCTTGCTGCATGCGGCACGACCCGACATCCAG ATGACCCAGACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTG GGCGATAGAGTGACCATCAGCTGTAGAGCCAGCCA GGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAAA AGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCAC ACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAAGCAGATT TTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACAGCCTGAC AATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATCGCTACCT ACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCTGCCTTACACCT TTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGTGGA GGTGGTTCTGGCGGAGGGGGATCTGGTGGAGGCGG TTCAGAAGTGAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACT GGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTAC AGTCAGCGGAGTGTCCCTGCCTGATTACGGCGTGTC CTGGATCAGACAGCCTCCTCGGAAAGGCCTGGAAT GGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACCTAC TACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATC AAGGACAACTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGAT GAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACT ATTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACG CCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACC GTTCTTCTACCACAACGCCCCGCCCCGCGACCGCCT ACTCCCGCTCCCACAATTGCATCACAACCCCTGTCT TTGAGACCCGAAGCTTGTGCGACCAGCTGCCGGTGGC GCGGTTACACGCGGGGGCTCGATTTCGCCTGTGAT ATATATATATGGGCCCCATTGGCTGGAACATGCGGA GTATTGCTTCTGAGCCTGGTGATTACCCTCTACTGTA AGAGAGGCCGGAAGAACTTCTTTATATATTCAAGC AGCCCTTTATGCGACCCGTTTCAGACTACCCAAGAGG AAGATGGATGCAGTTGCCGCTTTCAGAAAGAGGAG GAGGGCGGGTGCGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAG ATCCGCCGATGCTCCCGCCTATAAGCAGGGCCAAA ACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGGAGAAGA GAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAG AGATCCTGAAATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGA ATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGAGCTGCAGAAA GACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGAAT GAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAAGGGACACGAT GGACTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACCAAGGA TACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCC AAGAtaa	10 20 30 40
-----	---------------------	--	---

315	CircM971 - CD22	ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAG CTGCCCCATCCTGCCTTTCTGCTGATCCCCCAGGTTC AACTCCAGCAGTCTGGTCCCGGCCTCGTTAAACCAA GCCAGACTTTGTCTCTTACCTGTGCTATCAGTGCGG ATAGCGTGTCTAGTAATTCAGCCGCATGGAAGTGA TCCGACAATCACCGAGTAGGGGACTTGAATGGCTG GGTAGAACCTATTACCGGTCCAAATGGTACAATGAC TATGCAGTGTCTGTAAAAAGCAGGATCACGATCAA CCCTGATACGTCTAAAAACCAGTTTTCTCTGCAACT TAATAGTGTGACCCCTGAAGACACCGCTGTGTATTA CTGTGCACGGGAGGTTACCGGTGATCTTGAAGATGC TTTTGATATATGGGGCCAAGGTACGATGGTCACGGT GTCTAGTgggggaggcggcagcGACATACAGATGACGCAG AGCCCATCCAGTCTCTCCGCGTCTGTTGGTGACAGA GTGACTATTACATGTAGGGCGTCTCAGACCATTGG TCTTACCTCAATTGGTATCAACAGCGACCAGGCAAA GCACCGAACTTGCTCATTTACGCTGCCAGCTCACTC CAAAGTGGTGTGCCGTCCAGATTTAGTGGTAGGGGC AGTGGCACTGATTTCACTCTGACTATTTCAAGTCTTC AAGCTGAGGATTTTGCCACATACTACTGCCAGCAAA GTTACTCAATACCTCAGACTTTTGGACAGGGGACAA AATTGGAGATTAAAtccggaACCACAACGCCCCGCCCCG CGACCGCCTACTCCCGCTCCCACAATTGCATCACAA CCCCTGTCTTTGAGACCCGAAGCTTGTCGACCAGCT GCCGGTGGCGCGGTTTACACGCGGGGGCTCGATTTC GCCTGTGATATATATATATGGGCCCCATTGGCTGGA ACATGCGGAGTATTGCTTCTGAGCCTGGTGATTACC CTCTACTGTAAGAGAGGCCGGAAGAACTTCTTTAT ATATTCAAGCAGCCCTTTATGCGACCCGTTTCAGACT ACCCAAGAGGAAGATGGATGCAGTTGCCGCTTTCC AGAAGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAACTGAGAGTG AAGTTCAGCAGATCCGCCGATGCTCCCGCCTATAAG CAGGGCCAAAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCT GGGGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGC GGAGAGGCAGAGATCCTGAAATGGGCGGCAAGCCC AGACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGA GCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCG AGATCGGAATGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAA GGGACACGATGGACTGTACCAGGGACTGAGCACCG CCACCAAGGATACCTATGACGCCCTGCACATGCAG GCCCTGCCTCCAAGAtaa	10 20 30 40
-----	--------------------	--	---

316	CircCD19_22 二重特異性 29	ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAG CTGCCCCATCCTGCCTTTCTGCTGATCCCCGACATCC AGATGACCCAGACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGC CTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGTAGAGCCAG CCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGC AAAAGCCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTAC CACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACAGCCT GACAATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATCGCTA CCTACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCTGCCTTACA CCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCggcgg cggaggatccCAGGTTCAACTCCAGCAGTCTGGTCCCGG CCTCGTTAAACCAAGCCAGACTTTGTCTCTTACCTG TGCTATCAGTGCGGATAGCGTGTCTAGTAATTCAGC CGCATGGAACCTGGATCCGACAATCACCGAGTAGGG GACTTGAATGGCTGGGTAGAACCTATTACCGGTCCA AATGGTACAATGACTATGCAGTGTCTGTAAAAAGC AGGATCACGATCAACCCTGATACGTCTAAAAACCA GTTTTCTCTGCAACTTAATAGTGTGACCCCTGAAGA CACCGCTGTGTATTACTGTGCACGGGAGGTTACCGG TGATCTTGAAGATGCTTTTGATATATGGGGCCAAGG TACGATGGTCACGGTGTCTAGTGGCTCTACAAGCGG CAGCGGCAAACCTGGATCTGGCGAGGGATCTACCA AGGGCGACATACAGATGACGCAGAGCCCATCCAGT CTCTCCGCGTCTGTTGGTGACAGAGTGACTATTACA TGTAGGGCGTCTCAGACCATTTGGTCTTACCTCAAT TGGTATCAACAGCGACCAGGCAAAGCACCGAACTT GCTCATTTACGCTGCCAGCTCACTCCAAAGTGGTGT GCCGTCCAGATTTAGTGGTAGGGGCAGTGGCACTG ATTTCACTCTGACTATTTCAAGTCTTCAAGCTGAGG ATTTTGCCACATACTACTGCCAGCAAAGTTACTCAA TACCTCAGACTTTTGGACAGGGGACAAAATTGGAG ATTAAGgggggaggcggcagcGAAGTGAACTGCAAGAGT CTGGCCCTGGACTGGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGA GCGTGACCTGTACAGTCAGCGGAGTGTCCCTGCCTG ATTACGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCTCCTCGGA AAGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGC GAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCG GCTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGG TGTTCCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGAC ACCGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTAC GGCGGCAGCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGG CACCAGCGTGACCGTTTCTTCTtccggaACCACAACGC CCGCCCCGCGACCGCCTACTCCCGCTCCCACAATTG CATCACAACCCCTGTCTTTGAGACCCGAAGCTTGTC GACCAGCTGCCGGTGGCGCGGTTACACGCGGGGG CTCGATTTTCGCTGTGATATATATATATGGGGCCCA TTGGCTGGAACATGCGGAGTATTGCTTCTGAGCCTG GTGATTACCTCTACTGTAAGAGAGGCCGGAAGAA	10 20 30 40
-----	----------------------------	---	---

		ACTTCTTTATATATTCAAGCAGCCCTTTATGCGACCC G TTCAGACTACCCAAGAGGAAGATGGATGCAGTTG CCGCTTTCCAGAAGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAAC TGAGAGTGAAGTTCAGCAGATCCGCCGATGCTCCCG CCTATAAGCAGGGCCAAAACCAGCTGTACAACGAG CTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCT GGACAAGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAAATGGGCG GCAAGCCCAGACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTG TATAATGAGCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGC CTACAGCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGCAGAA GAGGCAAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGACTG AGCACCGCCACCAAGGATACCTATGACGCCCTGCA CATGCAGGCCCTGCCTCCAAGAtaa
--	--	---

10

20

30

40

50

40

		ATGCGGAGTATTGCTTCTGAGCCTGGTGATTACCT CTACTGTAAGAGAGGCCCGGAAGAACTTCTTTATAT ATTCAAGCAGCCCTTTATGCGACCCGTTTCAGACTAC CCAAGAGGAAGATGGATGCAGTTGCCGCTTTCCAG AAGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAACTGAGAGTGAA GTTCAGCAGATCCGCGGATGCTCCCGCCTATAAGCA GGGCCAAAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGG GGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGG AGAGGCAGAGATCCTGAAATGGGCGGCAAGCCCAG ACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGAGC TGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAG ATCGGAATGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAAGG GACACGATGGACTGTACCAGGGACTGAGCACCGCC ACCAAGGATACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGC CCTGCCTCCAAGAtaa
--	--	--

10

【0340】

一部の実施形態では、CARは、表10に列挙されるような配列を有する。

【0341】

(表11) CARDメイン配列。

20

配列番号	タンパク質	配列
318	4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL
319	CD3ζ 細胞内 ドメイン	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPMEGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR
320	CD28 細胞内 シグナル伝達 ドメイン	QVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMH WVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTM TRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCASGWDFDYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQS PSSLSASVGDRVTITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPK LLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCLQTYTTPDFGPGTKVEIK
321	FMC63 VH	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNALSKSLTIHKDNSKS QVFLKMNSLQTDDAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSS
322	FMC63 VL	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQ KPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISN LEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT

30

40

【0342】

一部の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるCARDメインは、表11に列挙されるような配列を有する。

【0343】

好ましい実施形態を本明細書に記載する。これらの好ましい実施形態の変形は、前述の説明を読めば、当業者に明らかになり得る。本発明者らは、当業者がかかる変形を適切に用いることを予期しており、本発明者らは、本発明が本明細書に具体的に記載されるのとは別様に実践されることを意図している。したがって、本発明は、準拠法によって容認さ

50

れているように、本明細書に添付の特許請求の範囲に記載される主題の全ての改変及び等価物を含む。さらに、その全ての可能な変形における上記の要素の任意の組み合わせは、本明細書に別様に示されない限りまたは別様に文脈によって明らかに矛盾しない限り、本発明によって包含される。

【実施例】

【0344】

Wesselhoeft et al. (2019) RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In Vivo. Molecular Cell. 74 (3), 508–520及びWesselhoeft et al. (2018) Engineering circular RNA for Potent and Stable Translation in Eukaryotic Cells. Nature Communications. 9, 2629は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0345】

本発明は、以下の実施例を参照することによってさらに詳細に説明されるが、以下の実施例に限定されることを意図するものではない。これらの実施例は、主題の発明の作製方法及び使用方法を当業者に完全な開示及び説明を提供することを目的として例示のありとあらゆる変形を包含し、本発明と見なすものの範囲を限定することを意図しない。

【0346】

20

実施例 1

実施例 1A：外部相同領域は、順列置換イントロンエクソン（PIE）環状化戦略を使用して長い前駆体RNAの環状化を可能にする。

全長脳心筋炎ウイルス（EMCV）IRESを含有する1.1 kb配列、ガウシアルシフェラーゼ（GLuc）発現配列、及び順列置換イントロン-エクソン（PIE）コンストラクトの二つの短いエクソンフラグメントを、T4ファージのチミジル酸シンターゼ（Td）遺伝子の順列置換グループI触媒イントロンの3'及び5'イントロン間に挿入した。前駆体RNAは、ランオフ転写によって合成した。環状化を、前駆体RNAを、マグネシウムイオン及びGTPの存在下で加熱することにより試みたが、スプライシング産物は得られなかった。

30

【0347】

完全に相補的な9ヌクレオチド及び19ヌクレオチド長の相同領域を設計し、前駆体RNAの5'及び3'末端に追加した。これらの相同アームの追加により、前駆体RNAバンドの消失によって評価されるように、スプライシング効率が、9ヌクレオチド相同領域で0から16%に、19ヌクレオチド相同領域で48%に増加した。

【0348】

スプライシング産物を、RNase Rで処理した。RNase Rで処理したスプライシング反応物の推定スプライスジャンクションにわたって配列決定すると、ライゲーションされたエクソンが明らかになり、RNase Rで処理したスプライシング反応物を、オリゴヌクレオチドを標的としたRNase Hで消化すると、RNase Hで消化された線状前駆体によって得られた2つのバンドとは対照的に、単一のバンドが産生された。これは、環状RNAが、9または19ヌクレオチド長の外部相同領域を含有する前駆体RNAのスプライシング反応物の主要な産物であることを示す。

40

【0349】

実施例 1B：IRES及びPIEスプライス部位の二次構造を保存するスペーサーは、環状化の効率を増加する。

一連のスペーサーを設計し、3' PIEスプライス部位及びIRES間に挿入した。これらのスペーサーは、IRES、3' PIEスプライス部位、及び／または5'スプライス部位のイントロン配列内の二次構造を保存するまたは破壊するように設計した。二次構造を保存するように設計されたスペーサー配列の追加は、87%スプライシング効率をもたらした。

50

たが、破壊的なスペーサー配列の追加は、検出可能なスプライシングをもたらさなかった。

【0350】

実施例2

実施例2A：外部相同領域に加えて内部相同領域は、スプライシングバブルを作製し、いくつかの発現配列の翻訳を可能にする。

スペーサーは、非構造化、イントロン及びIRES配列に非相同であり、スペーサー-スペーサー相同領域を含有するように設計した。これらを、外部相同領域、EMCV IRES、及びガウシアルシフェラーゼ（全長：1289 nt）、ホタルシフェラーゼ（2384 nt）、eGFP（1451 nt）、ヒトエリスロポエチン（1313 nt）、及びCas9エンドヌクレアーゼ（4934 nt）の発現配列を含有するコンストラクトの5'エクソン及びIRES間ならびに3'エクソン及び発現配列間に挿入した。5つのコンストラクト全ての環状化を達成した。T4ファージ及びアナベナイントロンを利用したコンストラクトの環状化は、ほぼ同等であった。環状化効率は、配列が短いほど高かった。翻訳を測定するために、各コンストラクトを、HEK293細胞にトランスフェクトした。ガウシア及びホタルシフェラーゼをトランスフェクトした細胞は、発光によって測定されるように強い応答を示し、ヒトエリスロポエチンは、エリスロポエチン circRNAでトランスフェクトした細胞の培地で検出可能であり、EGFP蛍光は、EGFP circRNAでトランスフェクトした細胞から観察された。Cas9 circRNAとGFPに対するsgRNAの、GFPを構成的に発現する細胞への同時トランスフェクションにより、sgRNAのみの対照と比較して、細胞の最大97%で蛍光が消失した。

【0351】

実施例2B：CVB3 IRESの使用は、タンパク質産生を増加させる。

内部及び外部相同領域、ならびにガウシアルシフェラーゼまたはホタルシフェラーゼ発現配列のいずれかを含有する異なるIRESを有するコンストラクトを作製した。タンパク質産生は、トランスフェクションから24時間後のHEK293細胞の上清における発光によって測定した。コクサッキーウイルスB3（CVB3）IRESコンストラクトは、両方の場合において最も多くのタンパク質を産生した。

【0352】

実施例2C：ポリAまたはポリACスペーサーの使用は、タンパク質産生を増加させる。

30ヌクレオチド長のポリAまたはポリACスペーサーを、実施例2Bでタンパク質を産生した各IRESを伴うコンストラクトのIRES及びスプライスジャンクション間に追加した。ガウシアルシフェラーゼ活性は、トランスフェクションから24時間後のHEK293細胞の上清における発光によって測定した。両方のスペーサーは、スペーサーを伴わない対照コンストラクトよりも、全てのコンストラクトで発現を改善した。

【0353】

実施例3

環状RNAでトランスフェクトされたHEK293またはHeLa細胞は、同等の未修飾または修飾線状RNAでトランスフェクトされた細胞よりも多くのタンパク質を産生する。

HPLCで精製したガウシアルシフェラーゼをコードするcircRNA（CVB3-GLuc-pAC）を、標準的な未修飾5'メチルグアノシンキャップ及び3'ポリAテール線状GLuc mRNA、ならびに市販のヌクレオシド修飾（シュドウリジン、5-メチルシトシン）線状GLuc mRNA（Trilink製）と比較した。トランスフェクション24時間後に発光を測定し、circRNAが、HEK293細胞において未修飾線状mRNAより811.2%多いタンパク質を産生し、修飾mRNAより54.5%多いタンパク質を産生したことが明らかになった。同様の結果が、HeLa細胞、及びヒトエリスロポエチンをコードする最適化されたcircRNAと5-メトキシウリジンで修飾された線状mRNAとの比較において得られた。

【0354】

発光データは、6日間にわたって収集した。HEK293細胞では、circRNAト

ランスフェクションは80時間のタンパク質産生半減期をもたらし、それに対し、未修飾線状mRNAは43時間、及び修飾線状mRNAは45時間であった。HeLa細胞では、circRNAトランスフェクションは116時間のタンパク質産生半減期をもたらし、それに対し、未修飾線状mRNAは44時間、及び修飾線状mRNAは49時間であった。CircRNAは、両方の細胞型においてその寿命にわたって、未修飾及び修飾線状mRNAの両方よりも実質的に多くのタンパク質を産生した。

【0355】

実施例4

実施例4A: RNase消化、HPLC精製、及びホスファターゼ処理によるcircRNAの精製は、免疫原性を低減する。完全に精製された環状RNAは、未精製または部分的に精製された環状RNAよりも免疫原性が有意に低い。タンパク質発現安定性及び細胞生存率は、細胞型及び環状RNA純度に依存する。

ヒト胎児腎臓293 (HEK293) 及びヒト肺癌A549細胞を、

a. 未精製GLuc環状RNAスプライシング反応物の産物、

b. スプライシング反応物のRNase R消化の産物、

c. スプライシング反応物のRNase R消化及びHPLC精製の産物、または

d. スプライシング反応物のRNase消化、HPLC精製、及びホスファターゼ処理の産物

でトランスフェクトした。

【0356】

スプライシング反応物のRNase R消化は、トランスフェクトされていない対照と比較して、A549細胞においてサイトカイン放出を防ぐには不十分であった。

【0357】

HPLC精製の追加は、またサイトカイン放出を防ぐには不十分であったが、未精製スプライシング反応物と比較して、インターロイキン-6 (IL-6) が有意に低下し、インターフェロン-α1 (IFN-α1) が有意に増加した。

【0358】

HPLC精製後及びRNase R消化前にホスファターゼ処理を追加すると、A549細胞において評価された全ての上方制御されたサイトカインの発現が劇的に低下した。分泌された単球化学誘引物質タンパク質1 (MCP1)、IL-6、IFN-α1、腫瘍壊死因子α (TNFα)、及びIFNγ誘導性タンパク質-10 (IP-10) は、検出不可能またはトランスフェクトされていないベースラインレベルまで低下した。

【0359】

HEK293細胞では実質的なサイトカイン放出はなかった。A549細胞は、より高純度の環状RNAでトランスフェクトすると、GLuc発現安定性及び細胞生存率が増加した。完全に精製された環状RNAは、トランスフェクトされた293細胞と同様の安定性表現型を有した。

【0360】

実施例4B: 環状RNAは、有意な免疫原性を引き起こさず、RIG-Iリガンドではない。

A549細胞を、スプライシング反応物の産物でトランスフェクトした。

【0361】

A549細胞を、

a. 未精製環状RNA、

b. 高分子量 (線状及び環状連結) RNA、

c. 環状 (ニックの入った) RNA、

d. 精製環状RNAの初期画分 (ニックの入ったRNAピークとの重複が多い)、

e. 精製環状RNAの後期画分 (ニックの入ったRNAピークとの重複が少ない)、

f. 環状化中に切除されたイントロン、または

g. ビヒクル (すなわち、トランスフェクトされていない対照)

でトランスフェクトした。

【0362】

前駆体RNAは、スプライシング反応物から好適に純粋な線状前駆体RNAを取得することが困難なため、スプライス部位欠失突然変異体(DS)の形態で別個で合成及び精製した。サイトカイン放出及び細胞生存率を、各場合において測定した。

【0363】

スプライシング反応物内に存在する大半の種、ならびに前駆体RNAに応答して、強力なIL-6、RANTES、及びIP-10の放出が観察された。初期circRNA画分は、他の非circRNA画分に匹敵するサイトカイン応答を誘発した。これは、比較的少量の線状RNA夾雑物でさえ、A549細胞において実質的な細胞性免疫応答を誘発できることを示す。後期circRNA画分は、トランスフェクトされていない対照からのサイトカイン応答を超えるサイトカイン応答を誘発しなかった。トランスフェクション36時間後のA549細胞生存率は、他の全ての画分と比較して、後期circRNA画分で有意に大きかった。

【0364】

後期circRNA HPLC画分、前駆体RNAまたは未精製スプライシング反応物を用いたA549細胞のトランスフェクション時のRIG-I及びIFN-β1転写産物誘導を分析した。RIG-I及びIFN-β1両方の転写産物の誘導は、前駆体RNA及び未精製スプライシング反応物よりも後期circRNA画分で弱かった。スプライシング反応物のRNase R処理だけでは、この効果を取り除くのに十分ではなかった。非常に少量のRIG-Iリガンド3p-hpRNAを環状RNAに加えると、実質的なRIG-I転写が誘導された。HeLa細胞では、RNase Rで消化したスプライシング反応物のトランスフェクションは、RIG-I及びIFN-β1を誘導したが、精製circRNAでは誘導されなかった。全体として、HeLa細胞は、A549細胞よりも夾雑RNA種に対する感受性が低かった。

【0365】

スプライシング反応物または完全に精製されたcircRNAを用いたA549細胞のトランスフェクションから最初の8時間以内のRIG-I、IFN-β1、IL-6、及びRANTES転写産物誘導をモニタリングする経時的実験では、circRNAに対する一過性の応答は明らかにならなかった。精製されたcircRNAも同様に、RAW264.7マウスマクロファージにおいて炎症促進性転写物を誘導できなかった。

【0366】

A549細胞を、EMCV IRES及びEGFP発現配列を含有する精製circRNAでトランスフェクトした。これは、炎症促進性転写物の実質的な誘導を産生することはできなかった。これらのデータは、スプライシング反応物の非環状成分が、以前の研究で観察された免疫原性の原因であり、circRNAがRIG-Iの天然リガンドではないことを実証する。

【0367】

実施例5

環状RNAは、TLRによる検出を回避する。

TLR3、7、及び8レポーター細胞株を、複数の線状または環状RNAコンストラクトでトランスフェクトし、分泌された胚性アルカリホスファターゼ(SEAP)を測定した。

【0368】

線状化RNAは、イントロン及び相同アームの配列を欠失させることによって構築した。次に、線状RNAコンストラクトを、ホスファターゼで処理し(キャップされたRNAの場合、キャップした後)、HPLCによって精製した。

【0369】

試みたトランスフェクションのいずれも、TLR7レポーター細胞において応答を産生しなかった。TLR3及びTLR8レポーター細胞は、キャップされた線状化RNA、ポ

10

20

30

40

50

リアデニル化線状化RNA、ニックの入ったcircRNA HPLC画分、及び初期circRNA画分によって活性化された。後期circRNA画分及びm1ψ-mRNAは、どの細胞株でもTLR媒介応答を誘発しなかった。

【0370】

2番目の実験では、circRNAを、2つの方法：マグネシウムイオンの存在下での熱を用いたcircRNAの処理、ならびにDNAオリゴヌクレオチド誘導RNase H消化を使用して線状化した。どちらの方法でも、大部分の完全長線状RNAと、少量のインタクトなcircRNAが得られた。TLR3、7、及び8レポーター細胞を、環状RNA、熱により分解された環状RNA、またはRNase Hにより分解された環状RNAでトランスフェクトし、SEAP分泌をトランスフェクションから36時間後に測定した。TLR8レポーター細胞は、分解された環状RNAの両方の形態に応答してSEAPを分泌したが、モックトランスフェクションよりも環状RNAトランスフェクションに対して大きな応答を産生しなかった。インビトロで転写された線状化RNAによるTLR3の活性化にもかかわらず、分解またはインタクト条件では、TLR3及びTLR7レポーター細胞における活性化は観察されなかった。

【0371】

実施例6

未修飾環状RNAは、線状RNAよりも増加した持続的なインビボタンパク質発現を産生する。

未修飾及びm1ψ修飾ヒトエリスロポエチン(hEpo)線状mRNA及びcircRNAを用いて、マウスに注射し、HEK293細胞をトランスフェクトした。m1ψ-mRNA及び未修飾circRNAの等モルトランスフェクションにより、HEK293細胞で強力なタンパク質発現がもたらされた。hEpo線状mRNA及びcircRNAは、HEK293及びA549細胞の等重量トランスフェクション時のGLuc線状mRNA及びcircRNAと比較して、同様の相対的なタンパク質発現パターン及び細胞生存率を示した。

【0372】

マウスでは、hEpo circRNAまたは線状mRNAを内臓脂肪に注射した後、hEpoが血清中に検出された。未修飾circRNAの注射後に検出されたhEpoは、未修飾またはm1ψ-mRNAからのものよりもゆっくりと減衰し、注射後42時間でも依然として存在していた。血清hEpoは、未精製circRNAスプライシング反応物または未修飾線状mRNAの注射時には急速に下降した。未精製スプライシング反応物の注射は、血清中で検出可能なサイトカイン応答を産生し、これは精製circRNAを含む他のRNAでは観察されなかった。

【0373】

実施例7

環状RNAは、脂質ナノ粒子を介してインビボまたはインビトロで効果的に送達されることができる。

精製環状RNAを、イオン化可能なリポイドcKK-E12を用いて脂質ナノ粒子(LNP)へと製剤化した(Dong et al., 2014; Kauffman et al., 2015)。粒子は、5moUで修飾された市販の対照線状mRNAを含有する粒子と同様の平均サイズ、多分散度指数、及び封入効率を備えた均一なマルチメラ構造を形成した。

【0374】

精製hEpo circRNAは、LNPに封入し、HEK293細胞に加えた場合、5moU-mRNAよりも高い発現を示した。HEK293細胞におけるLNP-RNAからの発現安定性は、5moU-mRNA及びcircRNAの両方に関する減衰のわずかな遅延を除いて、トランスフェクション試薬によって送達されたRNAの発現安定性と同様であった。未修飾circRNA及び5moU-mRNAは両方とも、インビトロでRIG-I/IFN-β1を活性化できなかった。

【0375】

マウスでは、LNP-RNAは、内臓脂肪組織への局所注射または肝臓への静脈内送達によって送達された。どちらの場合も、送達から6時間後、circRNAからの血清hEpo発現は低かったが、5moU-mRNAからの発現と同等であった。未修飾LNP-circRNAの脂肪注射後に検出された血清hEpoは、LNP-5moU-mRNAからのものよりもゆっくりと減衰し、血清中に存在する発現減衰の遅延はインビトロで認められたものと同様であったが、LNP-circRNAまたはLNP-5moU-mRNAの静脈内注射後の血清hEpoは、およそ同じ速度で減衰した。これらの場合のいずれにおいても、血清サイトカインまたは局所RIG-I、TNF α 、もしくはIL-6転写産物誘導において増加はなかった。

10

【0376】

実施例8

HEK293、HepG2、及び1C1C7細胞におけるIRESによる発現と機能安定性。

アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及びさまざまなIRESを含むコンストラクトを環状化した。100ngの各環状化反応物を、Lipofectamine MessengerMaxを使用して、20,000個のHEK293細胞、HepG2細胞、及び1C1C7細胞に別個にトランスフェクトした。各上清における発光は、タンパク質発現の尺度として24時間後に評価した。HEK293細胞では、クロヒウイルスB、サリウイルスFHB、アイチウイルス、サリウイルスHG-J1、及びエンテロウイルスJ IRESを含むコンストラクトが、24時間で最も多くの発光を産生した（図1A）。HepG2細胞では、アイチウイルス、サリウイルスFHB、EMCV-Cf、CVA3 IRESを含むコンストラクトが、24時間で高い発光を産生した（図1B）。1C1C7細胞では、サリウイルスFHB、アイチウイルス、サリウイルスNG-J1、及びサリウイルスA SZ-1 IRESを含むコンストラクトが、24時間で高い発光を産生した（図1C）。

20

【0377】

より大きなIRESが、24時間でより大きな発光を産生する傾向が観察された。総配列長が短いと環状化効率が増加する傾向があるため、高い発現及び比較的短いIRESの選択は、コンストラクトの改善をもたらし得る。HEK293細胞では、クロヒウイルスB IRESを使用したコンストラクトが、特に同様の長さの他のIRESと比較して、最も高い発光を産生した（図2A）。IRESサイズに対してプロットされたHepG2及び1C1C7細胞におけるIRESコンストラクトからの発現を、図2B及び2Cに示す。

30

【0378】

HepG2及び1C1C7細胞における選択されたIRESコンストラクトの機能安定性を、3日間にわたって測定した。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、20,000個の細胞を100ngの各環状化反応物でトランスフェクトした後24時間毎に測定し、その後完全に培地を交換した。サリウイルスA GUT及びサリウイルスFHBは、HepG2細胞で最も高い機能安定性を呈し、サリウイルスN-J1及びサリウイルスFHBは、1C1C7細胞で最も安定した発現を産生した（図3A及び3B）。

40

【0379】

実施例9

Jurkat細胞におけるIRESによる発現及び機能安定性。

アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及び以前に試験したIRESのサブセットを含む2セットのコンストラクトを環状化した。60,000個のJurkat細胞を、1 μ gの各環状化反応物でエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションから24時間後に、上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を測定した。セット間の比較及び以前に定義されたIRESの有効性との比較の

50

ために、C V B 3 I R E Sコンストラクトを両方のセットに含んだ。C V B 1及びサリウイルスA S Z 1 I R E Sコンストラクトは、24時間で最も多くの発現を産生した。データは、図4A及び4Bに見出すことができる。

【0380】

各ラウンドのエレクトロポレーションしたJ u r k a t細胞におけるI R E Sコンストラクトの機能安定性を、3日間にわたって測定した。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、60,000個の細胞を1µgの各環状化反応物でエレクトロポレーションした後24時間毎に測定し、その後完全に培地を交換した(図5A及び5B)。

【0381】

サリウイルスA S Z 1及びサリウイルスA B N 2 I R E Sコンストラクトは、他のコンストラクトと比較して高い機能安定性を有した。

【0382】

実施例10

J u r k a t細胞における環状及び線状RNAの発現、機能安定性、及びサイトカイン放出。

アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及びサリウイルスF H B I R E Sを含むコンストラクトを環状化した。ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び約150ntポリAテールを含むmRNA、ならびに100%のウリジンを5'-メトキシウリジン(5moU)に置き換えるように修飾されたものは市販されており、T r i l i n kから購入した。5moUヌクレオチド修飾は、mRNAの安定性及び発現を改善することが示されている(B i o c o n j u g C h e m . 2016 M a r 16 ; 27(3):849-53)。J u r k a t細胞における修飾mRNAの発現、環状化反応物(未純化)、及びサイズ排除HPLCによって精製されたc i r c RNA(純粋)を測定し、比較した(図6A)。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、60,000個の細胞を1µgの各RNA種でエレクトロポレーションしてから24時間後に測定した。

【0383】

上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光は、60,000個の細胞を1µgの各RNA種でエレクトロポレーションした後24時間毎に測定し、その後完全に培地を交換した。3日間にわたるJ u r k a t細胞における修飾mRNA及びc i r c RNAの機能安定性データの比較を、図6Bに示す。

【0384】

I F N γ (図7A)、I L - 6 (図7B)、I L - 2 (図7C)、R I G - I (図7D)、I F N - β 1 (図7E)、及びT N F α (図7F)転写産物誘導を、60,000個のJ u r k a t細胞を1µgの上記の各RNA種及び3p-hpRNA(R I G - Iアゴニストとして知られる5'三リン酸ヘアピンRNA)でエレクトロポレーションしてから18時間後に測定した。

【0385】

実施例11

単球及びマクロファージにおける環状及び線状RNAの発現。

アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及びサリウイルスF H B I R E Sを含むコンストラクトを環状化した。ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び約150ntポリAテールを含むmRNA、ならびに100%のウリジンを5'-メトキシウリジン(5moU)に置き換えるように修飾されたものは、T r i l i n kから購入した。環状及び修飾mRNAの発現を、ヒト初代単球(図8A)及びヒト初代マクロファージ(図8B)において測定した。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、60,000個の細胞を1µgの各RNA種でエレクトロポレーションしてから24時間後に測定した。発光は、ヒト初代マクロファージをエレクトロポレーションしてから4日後にも測定し、培地は24時間毎に交換した(図8C)。発光における差異は、いずれの場合も統計的に有意であった($p < 0.05$)。

10

20

30

40

50

【0386】

実施例12

初代T細胞におけるIRESによる発現及び機能安定性。

アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及び以前に試験したIRESのサブセットを含むコンストラクトを環状化し、反応産物をサイズ排除HPLCによって精製した。150,000個の初代ヒトCD3+T細胞を、1µgの各circRNAでエレクトロポレーションした。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、エレクトロポレーションから24時間後に測定した(図9A)。アイチウイルス及びCVB3 IRESコンストラクトは、24時間で最も多く発現した。

【0387】

発光はまた、各コンストラクトの機能安定性を比較するために、エレクトロポレーション後24時間毎に3日間にわたって測定した(図9B)。サリウイルスA SZ1 IRESを伴うコンストラクトが最も安定していた。

【0388】

実施例13

初代T細胞及びPBMCにおける環状及び線状RNAの発現及び機能安定性。

アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及びサリウイルスA SZ1 IRESまたはサリウイルスFHB IRESを含むコンストラクトを環状化した。ガウシアルシフェラーゼ発現配列及び約150ntポリAテールを含むmRNA、ならびに100%のウリジンを5-メトキシウリジン(5moU)に置き換えるように修飾されたものは、Trilinkから購入した。サリウイルスA SZ1 IRES HPLC精製環状及び修飾mRNAの発現を、ヒト初代CD3+T細胞において測定した。サリウイルスFHB HPLC精製環状、未精製環状及び修飾mRNAの発現を、ヒトPBMCにおいて測定した。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、150,000個の細胞を1µgの各RNA種でエレクトロポレーションしてから24時間後に測定した。初代ヒトT細胞に関するデータを図10A及び10Bに示し、PBMCに関するデータを図10Cに示す。精製環状RNA及び未精製環状RNAまたは線状RNA間の発現における差異は、いずれの場合も有意であった($p < 0.05$)。

【0389】

初代T細胞上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、コンストラクトの機能安定性を比較するために、エレクトロポレーション後24時間毎に3日間にわたって測定した。データを、図10Bに示す。精製環状RNA及び線状RNA間の1日目の測定からの相対発光における差異は、初代T細胞に関して2日目及び3日目の両方で有意であった。

【0390】

実施例14

アナベナイントロンにおける順列置換部位による環状化効率。

CVB3 IRES、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、アナベナイントロン／エクソン領域、スパーサー、内部相同領域、及び相同アームを含むRNAコンストラクトを産生した。従来のアナベナイントロン順列置換部位及びP9における5つの連続した順列置換部位を使用したコンストラクトの環状化効率を、HPLCによって測定した。P9における5つの連続した順列置換部位に関するHPLCクロマトグラムを、図11Aに示す。

【0391】

環状化効率は、さまざまな順列置換部位で測定した。環状化効率は、circRNA／(circRNA+前駆体RNA)のそれぞれに関するHPLCクロマトグラム曲線下面積として定義する。各順列置換部位での環状化効率のランク付けされた定量化を、図11Bに示す。3つの順列置換部位(図11Bに示している)を、さらなる調査のために選択した。

【0392】

この実施例における環状RNAは、インビトロ転写(IVT)によって環状化し、次に

10

20

30

40

50

スピнкаラムを介して精製した。環状化効率は、全てのコンストラクトに関して、 Mg^{2+} 及びグアノシンヌクレオチドとのインキュベーションの追加ステップを含めると、高くなる可能性があり得る；ただし、このステップの除去は、環状RNAコンストラクト間の比較、及び環状RNAコンストラクトの最適化を可能にした。このレベルの最適化は、キメラ抗原受容体をコードするものなどの大きなRNAコンストラクトで高い環状化効率を維持するのに特に有用である。

【0393】

実施例15

代替イントロンの環状化効率。

さまざまな種起源の順列置換グループ1イントロンまたは順列置換部位及び、CVB3 IRES、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、スペーサー、内部相同領域、及び相同アームを含むいくつかの定常エレメントを含有する前駆体RNAを作製した。環状化データは、図12に見出すことができる。図12Aは、前駆体、circRNA及びイントロンを分解するクロマトグラムを示す。図12Bは、イントロンコンストラクトの関数として、図12Aに示されるクロマトグラムに基づいて、環状化効率のランク付けされた定量化を提供する。

10

【0394】

この実施例における環状RNAは、インビトロ転写（IVT）によって環状化し、次にスピнкаラム精製を行った。環状化効率は、全てのコンストラクトに関して、 Mg^{2+} 及びグアノシンヌクレオチドとのインキュベーションの追加ステップを含めると、高くなる可能性があり得る；ただし、このステップの除去は、環状RNAコンストラクト間の比較、及び環状RNAコンストラクトの最適化を可能にする。このレベルの最適化は、キメラ抗原受容体をコードするものなどの大きなRNAコンストラクトで高い環状化効率を維持するのに特に有用である。

20

【0395】

実施例16

相同アームの存在または長さによる環状化効率。

CVB3 IRES、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、アナベナイントロン／エクソン領域、スペーサー、及び内部相同領域を含むRNAコンストラクトを産生した。3つのアナベナイントロン順列置換部位を表すコンストラクトを、30nt、25%GC相同アームを用いて、または相同アームを用いずに（「NA」）試験した。これらのコンストラクトは、 Mg^{2+} インキュベーションステップを伴わずに環状化することが可能であった。環状化効率を測定し、比較した。データは、図13に見出すことができる。環状化効率は、相同アームを欠く各コンストラクトでより高かった。図13Aは、環状化効率のランク付けされた定量化を提供する；図13Bは、前駆体、circRNA及びイントロンを分解するクロマトグラムを提供する。

30

【0396】

3つの順列置換部位のそれぞれについて、コンストラクトを、10nt、20nt、及び30ntのアーム長ならびに25%、50%、及び75%GC含量で作製した。これらのコンストラクトのスプライシング効率を測定し、相同アームを伴わないコンストラクトと比較した（図14）。スプライシング効率は、スプライシング反応物における総RNAに対する遊離イントロンの割合として定義する。

40

【0397】

図15A（左）は、スプライシング効率の改善に対する強い相同アームの寄与を示すHPLCクロマトグラムを示す。左上：75%GC含量、10nt相同アーム。中央左：75%GC含量、20nt相同アーム。左下：75%GC含量、30nt相同アーム。

【0398】

図15A（右）は、ニッキングの増加と対になったスプライシング効率の増加を示すHPLCクロマトグラムを示し、circRNAピークのショルダーとして現れている。右上：75%GC含量、10nt相同アーム。中央右：75%GC含量、20nt相同アーム。

50

ム。右下：75%GC含量、30nt相同アーム。

【0399】

図15B（左）は、改善された環状化効率を実証すると仮定された順列置換部位及び相同アームの選択された組み合わせを示す。

【0400】

図15B（右）は、E. coli ポリAポリメラーゼで処理された、改善された環状化効率を実証すると仮定された順列置換部位及び相同アームの選択された組み合わせを示す。

【0401】

この実施例における環状RNAは、インビトロ転写（IVT）によって環状化し、次にスピンカラム精製を行った。環状化効率は、全てのコンストラクトに関して、グアノシンヌクレオチドとの追加のMg²⁺インキュベーションステップを含めると、高くなる可能性があり得る；ただし、このステップの除去は、環状RNAコンストラクト間の比較、及び環状RNAコンストラクトの最適化を可能にした。このレベルの最適化は、キメラ抗原受容体をコードするものなどの大きなRNAコンストラクトで高い環状化効率を維持するのに特に有用である。

【0402】

実施例17

CARをコードする環状RNA

アナベナイントロン／エクソン領域、キムリアキメラ抗原受容体（CAR）発現配列、及びCVB3 IRESを含むコンストラクトを環状化した。100,000個のヒト初代CD3+T細胞を、500ngのcircRNAでエレクトロポレーションし、GFP及びホタルルシフェラーゼを安定して発現するRaji細胞と24時間共培養した。エフェクター対標的比（E：T比）0.75：1。100,000個のヒト初代CD3+T細胞を、モックエレクトロポレーションし、対照として共培養した（図16）。

【0403】

100,000個のヒト初代CD3+T細胞のセットを、モックエレクトロポレーションした、または1μgのcircRNAでエレクトロポレーションし、次にGFP及びホタルルシフェラーゼを安定して発現するRaji細胞と48時間共培養した。E：T比10：1（図17）。

【0404】

Raji 標的細胞の特異的溶解の定量化は、ホタル発光の検出によって決定した（図18）。モックエレクトロポレーションした、または異なるCAR配列をコードするcircRNAでエレクトロポレーションした100,000個のヒト初代CD3+T細胞を、GFP及びホタルルシフェラーゼを安定して発現するRaji細胞と48時間共培養した。特異的溶解率（%）は、1 - [CAR条件発光] / [モック条件発光] として定義した。E：T比10：1。

【0405】

実施例18

Jurkat細胞及び休止ヒトT細胞における環状及び線状RNAの発現及び機能安定性。

アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及び以前に試験したIRESのサブセットを含むコンストラクトを環状化し、反応産物をサイズ排除HPLCによって精製した。150,000個のJurkat細胞を、1μgの環状RNAまたは5mou-mRNAでエレクトロポレーションした。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、エレクトロポレーションから24時間後に測定した（図19A左）。150,000個の休止初代ヒトCD3+T細胞（刺激後10日）を、1μgの環状RNAまたは5mou-mRNAでエレクトロポレーションした。上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光を、エレクトロポレーションから24時間後に測定した（図19A右）。

【0406】

10

20

30

40

50

上清中の分泌されたガウシアルシフェラーゼからの発光は、エレクトロポレーション後24時間毎に測定し、その後完全に培地を交換した。機能安定性データを、図19Bに示す。環状RNAは、いずれの場合も線状RNAよりも機能安定性が高く、Jurkat細胞においてより顕著な差異があった。

【0407】

実施例19

線状RNAまたはさまざまな環状RNAコンストラクトでエレクトロポレーションした細胞のIFN- β 1、RIG-I、IL-2、IL-6、IFN γ 、及びTNF α 転写産物誘導。

アナベナイントロン／エクソン領域、ガウシアルシフェラーゼ発現配列、及び以前に試験したIRESのサブセットを含むコンストラクトを環状化し、反応産物をサイズ排除HPLCによって精製した。150,000個のCD3+ヒトT細胞を、1 μ gの環状RNA、5moU-mRNA、または免疫刺激陽性対照ポリイノシン：シトシンでエレクトロポレーションした。IFN- β 1（図20A）、RIG-I（図20B）、IL-2（図20C）、IL-6（図20D）、IFN- γ （図20E）、及びTNF- α （図20F）転写産物誘導を、エレクトロポレーションから18時間後に測定した。

【0408】

実施例20

異なる量の環状または線状RNAでエレクトロポレーションしたCAR発現細胞による標的細胞の特異的溶解及びIFN γ 転写産物誘導；異なるE:T比でのCAR発現細胞による標的及び非標的細胞の特異的溶解。

アナベナイントロン／エクソン領域、抗CD19 CAR発現配列、及びCVB3 IRESを含むコンストラクトを環状化し、反応産物をサイズ排除HPLCによって精製した。モックエレクトロポレーションした、または抗CD19 CAR配列をコードする異なる量のcircRNAでエレクトロポレーションした150,000個のヒト初代CD3+T細胞を、2:1のE:T比にて、GFP及びホタルシフェラーゼを安定して発現するRaji細胞と12時間共培養した。Raji標的細胞の特異的溶解率(%)は、ホタル発光の検出によって決定した（図21A）。特異的溶解率(%)は、1-[CAR条件発光]/[モック条件発光]として定義した。IFN γ 転写産物誘導は、エレクトロポレーションから24時間後に測定した（図21B）。

【0409】

150,000個のヒト初代CD3+T細胞を、モックエレクトロポレーションした、または抗CD19 CAR配列をコードする500ngのcircRNAもしくはm1 ψ -mRNAでエレクトロポレーションし、次に異なるE:T比にて、ホタルシフェラーゼを安定して発現するRaji細胞と24時間共培養した。Raji標的細胞の特異的溶解は、ホタル発光の検出によって決定した（図22A）。特異的溶解は、1-[CAR条件発光]/[モック条件発光]として定義した。

【0410】

CARを発現するT細胞をさらに、異なるE:T比にて、ホタルシフェラーゼを安定して発現するRajiまたはK562細胞と24時間共培養した。Raji標的細胞またはK562非標的細胞の特異的溶解は、ホタル発光の検出によって決定した（図22B）。特異的溶解率(%)は、1-[CAR条件発光]/[モック条件発光]として定義した。

【0411】

実施例21

CARをコードする環状RNAまたは線状RNAでエレクトロポレーションしたT細胞による標的細胞の特異的溶解。

アナベナイントロン／エクソン領域、抗CD19 CAR発現配列、及びCVB3 IRESを含むコンストラクトを環状化し、反応産物をサイズ排除HPLCによって精製した。ヒト初代CD3+T細胞を、500ngの環状RNAまたは等モル量のm1 ψ -mRNAでエレクトロポレーションし、それぞれがCD19を標的としたCARをコードした。

R a j i 細胞を C A R-T 細胞培養物に 7 日間にわたって 10 : 1 の E : T 比にて加えた。特異的溶解率 (%) を、両方のコンストラクトについて、1、3、5、及び 7 日目に測定した (図 23)。

【0412】

実施例 22

抗 C D 19 C A R または抗 B C M A C A R を発現する T 細胞による R a j i 細胞の特異的溶解。

アナベナイントロン／エクソン領域、抗 C D 19 または抗 B C M A C A R 発現配列、及び C V B 3 I R E S を含むコンストラクトを環状化し、反応産物をサイズ排除 H P L C によって精製した。150,000 個の初代ヒト C D 3 + T 細胞を、500 ng の c i r c R N A でエレクトロポレーションし、次に R a j i 細胞と 2 : 1 の E : T 比にて共培養した。特異的溶解率 (%) を、エレクトロポレーションから 12 時間後に測定した (図 24)。

【0413】

実施例 23

化合物の合成

本発明の代表的なイオン化可能脂質の合成は、P C T 出願 P C T / U S 2016 / 052352、P C T / U S 2016 / 068300、P C T / U S 2010 / 061058、P C T / U S 2018 / 058555、P C T / U S 2018 / 053569、P C T / U S 2017 / 028981、P C T / U S 2019 / 025246、P C T / U S 2018 / 035419、P C T / U S 2019 / 015913、ならびに米国出願公開第 20190314524 号、同第 20190321489 号、及び同第 20190314284 号 (それぞれの内容が、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載されている。

【0414】

実施例 24

ナノ粒子組成物の産生

細胞への環状 R N A の送達に使用するための安全及び効果的なナノ粒子組成物を調査するために、一連の製剤を調製し、試験する。具体的には、ナノ粒子組成物の脂質成分中の特定のエレメント及びその比率を最適化する。

【0415】

ナノ粒子は、一方が環状 R N A を含有し、他方が脂質成分を有する 2 つの流体ストリームの混合プロセス、例えばマイクロフルイディクス及び T ジャンクション混合で作製できる。

【0416】

脂質組成物は、イオン化可能脂質、任意選択でヘルパー脂質 (例えば A v a n t i P o l a r L i p i d s , A l a b a s t e r , A L から入手可能な、D O P E 、D S P C 、またはオレイン酸)、P E G 脂質 (例えば A v a n t i P o l a r L i p i d s , A l a b a s t e r , A L から入手可能な、1,2-ジミリスチル-s n-グリセロールメトキシポリエチレングリコール、P E G - D M G としても知られる)、及び構造脂質、例えばコレステロールを、約、例えば、溶媒、例えば、エタノール中 50 mM の濃度にて組み合わせることにより調製される。溶液は、例えば、-20℃で保管するために冷蔵するべきである。脂質を組み合わせ、所望のモル比を生成し (例えば、下の表 12 及び 13 を参照されたい)、水及びエタノールで希釈して、最終脂質濃度を、例えば、約 5 . 5 mM 及び約 25 mM 間にする。

【0417】

(表 12)

10

20

30

40

50

製剤番号	説明
1	C12-200、DOPE、Chol、及びDMG-PEG2K（40：30：25：5）の50mg/mLエタノール溶液の一定分量を混合し、エタノールで希釈して、3mLの最終容量とする。別々に、circRNAの緩衝水溶液（10mMクエン酸塩／150mM NaCl、pH4.5）を、1mg/mLストックから調製する。脂質溶液を、circRNA水溶液中に急速に注射し、振とうして、20%エタノール中の最終懸濁液を得る。結果得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS（pH7.4）で透析濾過し、濃縮し、2～8℃で保管する。
2	DODAP、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K（18：56：20：6）の50mg/mLエタノール溶液の一定分量を混合し、エタノールで希釈して、3mLの最終容量とする。別々に、緩衝水溶液（10mMクエン酸塩／150mM NaCl、pH4.5）のEPO circRNAを、1mg/mLストックから調製する。脂質溶液を、circRNA水溶液中に急速に注射し、振とうして、20%エタノール中の最終懸濁液を得る。結果として得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS（pH7.4）で透析濾過し、濃縮し、2～8℃で保管する。最終濃度=1.35mg/mL EPO circRNA（封入）。Zave=75.9nm（Dv（50）=57.3nm；Dv（90）=92.1nm）。
3	HGT4003、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K（50：25：20：5）の50mg/mLエタノール溶液の一定分量を混合し、エタノールで希釈して、3mLの最終容量とする。別々に、circRNAの緩衝水溶液（10mMクエン酸塩／150mM NaCl、pH4.5）を、1mg/mLストックから調製する。脂質溶液を、circRNA水溶液中に急速に注射し、振とうして、20%エタノール中の最終懸濁液を得る。結果得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS（pH7.4）で透析濾過し、濃縮し、2～8℃で保管する。

10

20

30

40

50

4	ICE、DOPE及びDMG-PEG2K（70：25：5）の50 mg/mLエタノール溶液の一定分量を混合し、エタノールで希釈して、3 mLの最終容量とする。別々に、circRNAの緩衝水溶液（10 mMクエン酸塩／150 mM NaCl、pH 4.5）を、1 mg/mLストックから調製する。脂質溶液を、circRNA水溶液中に急速に注射し、振とうして、20%エタノール中の最終懸濁液を得る。結果得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS（pH 7.4）で透析濾過し、濃縮し、2～8℃で保管する。	10
5	HGT5000、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K（40：20：35：5）の50 mg/mLエタノール溶液の一定分量を混合し、エタノールで希釈して、3 mLの最終容量とする。別々に、緩衝水溶液（10 mMクエン酸塩／150 mM NaCl、pH 4.5）のEPO circRNAを、1 mg/mLストックから調製する。脂質溶液を、circRNA水溶液中に急速に注射し、振とうして、20%エタノール中の最終懸濁液を得る。結果得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS（pH 7.4）で透析濾過し、濃縮し、2～8℃で保管する。最終濃度=1.82 mg/mL EPO mRNA（封入）。Zave=105.6 nm（Dv（50）=53.7 nm；Dv（90）=157 nm）。	20
6	HGT5001、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K（40：20：35：5）の50 mg/mLエタノール溶液の一定分量を混合し、エタノールで希釈して、3 mLの最終容量とする。別々に、緩衝水溶液（10 mMクエン酸塩／150 mM NaCl、pH 4.5）のEPO circRNAを、1 mg/mLストックから調製する。脂質溶液を、circRNA水溶液中に急速に注射し、振とうして、20%エタノール中の最終懸濁液を得る。結果得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS（pH 7.4）で透析濾過し、濃縮し、2～8℃で保管する。	30

【0418】

一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、表12に記載するような製剤を有する。

【0419】

(表13)

組成物（モル%）	成分
40:20:38.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
45:15:38.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
50:10:38.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
55:5:38.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG

10

20

30

40

50

組成物（モル％）	成分
60:5:33.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
45:20:33.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
50:20:28.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
55:20:23.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
60:20:18.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
40:15:43.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
50:15:33.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
55:15:28.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
60:15:23.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
40:10:48.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
45:10:43.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
55:10:33.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
60:10:28.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
40:5:53.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
45:5:48.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
50:5:43.5:1.5	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
40:20:40:0	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
45:20:35:0	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
50:20:30:0	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
55:20:25:0	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
60:20:20:0	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG
40:15:45:0	化合物：リン脂質：フィトステロール*:PEG-DMG

【0420】

一部の実施形態では、輸送ビヒクルは、表13に記載するような製剤を有し、ここで、化合物は、本明細書に記載するような環状RNAを指す。

【0421】

c i r c R N Aを含むナノ粒子組成物の場合、脱イオン水中0.1mg/mlの濃度のc i r c R N Aの溶液を、緩衝液、例えば、pH3~4間の50mMクエン酸ナトリウム緩衝液に希釈して、ストック溶液を形成する。

【0422】

環状RNA及び脂質成分を含むナノ粒子組成物を、脂質溶液を、環状RNAを約5:1~約50:1間の脂質成分対c i r c R N Aの重量:重量比率にて含む溶液と組み合わせ

ることによって調製する。脂質溶液は、例えば、NanoAssemblrマイクロ流体ベースのシステムを使用して、約10ml/分～約18ml/分間の流速でcircRNA溶液に迅速に注射して、約1:1～約4:1間の水対エタノール比率を伴う懸濁液を産生する。

【0423】

ナノ粒子組成物を、透析によって処理して、エタノールを除去して、緩衝液交換を達成することができる。製剤を、分子量カットオフが10kDaのSlide-A-Lyzerカセット(Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL)を使用して、一次生成物の200倍の容量のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、pH7.4に対して、2回透析する。1回目の透析は、室温で3時間実施した。次に、製剤を、終夜4℃にて透析する。結果得られたナノ粒子懸濁液を、0.2μmの滅菌フィルター(Sarstedt, Numbrecht, Germany)を通してガラスバイアルに濾過し、圧着クロージャーで密閉する。0.01mg/ml～0.10mg/mlのナノ粒子組成物溶液が、一般的に取得される。

【0424】

上記の方法は、ナノ沈殿及び粒子形成を誘導する。

【0425】

Tジャンクション及び直接注射を含むがこれに限定されない代替的なプロセスを使用し、同じナノ沈殿を達成し得る。

【0426】

B. ナノ粒子組成物の特徴評価

Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK)を使用して、ナノ粒子組成物の粒径、多分散性指数(PDI)及びゼータ電位を、粒径の決定においては1×PBS、及びゼータ電位の決定においては15mMのPBSで決定することができる。

【0427】

紫外可視分光法を使用して、ナノ粒子組成物中のcircRNAの濃度を決定することができる。1×PBSに希釈した100μLの製剤を4:1(v/v)のメタノール及びクロロホルムの混合物900μLに加える。混合後、溶液の吸光度スペクトルを、例えば、DU 800分光光度計(Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)で、230nm～330nm間で記録する。ナノ粒子組成物中のcircRNAの濃度は、その組成物中に使用されているcircRNAの吸光係数ならびに、波長、例えば、260nmでの吸光度及び、波長、例えば、330nmでのベースライン値間の差に基づいて計算することができる。

【0428】

QUANT-IT (商標) RIBOGREEN (登録商標) RNAアッセイ(Invitrogen Corporation Carlsbad, CA)を使用して、ナノ粒子組成物によるcircRNAの封入を評価することができる。試料を、TE緩衝液(10mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH7.5)中およそ約5μg/mlの濃度まで希釈する。50μLの希釈試料を、ポリスチレン96ウェルプレートに移し、50μLのTE緩衝液または50μLの2%Triton X-100溶液のいずれかをウェルに加える。プレートを、37℃の温度にて15分間インキュベートする。RIBOGREEN (登録商標) 試薬を、1:100でTE緩衝液に希釈し、100μLのこの溶液を各ウェルに加える。蛍光強度は、蛍光プレートリーダー(Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA)を使用して、励起波長、例えば、約480nm及び発光波長、例えば、約520nmにて測定することができる。試薬ブランクの蛍光値を試料の各値から引き、遊離circRNAのパーセンテージを、インタクトな試料(Triton X-100を添加しない)の蛍光強度を破壊試料(Triton X-100の添加によって生じる)の蛍光値で除することで決定する。

【0429】

C. インビボ製剤研究：

さまざまなナノ粒子組成物がどのように効果的にcircRNAを標的細胞に送達するかをモニターするために、circRNAを含む異なるナノ粒子組成物を調製し、げっ歯類集団に投与する。マウスに、脂質ナノ粒子製剤を伴うナノ粒子組成物を含む単回用量を、静脈内、筋肉内、動脈内、または腫瘍内投与する。一部の例では、マウスに用量を吸入させ得る。用量サイズは、 $0.001\text{mg/kg} \sim 10\text{mg/kg}$ の範囲であってよく、この場合 10mg/kg は、マウスの体質量 1kg 毎にナノ粒子組成物に 10mg のcircRNAを含む用量を説明する。PBSを含む対照組成物も採用し得る。

【0430】

ナノ粒子組成物をマウスに投与する際、特定の製剤及びその用量の用量送達プロファイル、用量応答、及び毒性を、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、生物発光イメージング、または他の方法によって測定することができる。タンパク質発現の時間経過も評価することができる。評価のためにげっ歯類から収集した試料には、血液及び組織（例えば、筋肉内注射部位からの筋肉組織及び内部組織）が含まれ得る；試料収集には、動物の犠牲が含まれ得る。

【0431】

circRNAを含む組成物の投与によって誘導されるより高いレベルのタンパク質発現は、より高いcircRNA翻訳及び／またはナノ粒子組成物circRNA送達効率を示すだろう。非RNA成分は翻訳機構自体に影響を与えないと考えられていないため、タンパク質発現のレベルが高いことは、他のナノ粒子組成物またはその非存在と比べて、所与のナノ粒子組成物によるcircRNAの送達効率が高いことを示している可能性が高い。

【0432】

実施例 25

ナノ粒子組成物の特徴評価

Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK) を使用して、輸送ビヒクル組成物の粒径、多分散性指数（PDI）及びゼータ電位を、粒径の決定においては $1 \times \text{PBS}$ 、及びゼータ電位の決定においては 15mM のPBSで決定することができる。

【0433】

紫外可視分光法を使用して、輸送ビヒクル組成物中の治療剤及び／または予防剤（例えば、RNA）の濃度を決定することができる。 $1 \times \text{PBS}$ に希釈した $100\mu\text{L}$ の製剤を $4:1$ （v/v）のメタノール及びクロロホルムの混合物 $900\mu\text{L}$ に加える。混合後、溶液の吸光度スペクトルを、例えば、DU 800分光光度計（Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA）で、 $230\text{nm} \sim 330\text{nm}$ 間で記録する。輸送ビヒクル組成物中の治療剤及び／または予防剤の濃度は、その組成物中に使用されている治療剤及び／または予防剤の吸光係数ならびに、波長、例えば、 260nm での吸光度及び、波長、例えば、 330nm でのベースライン値間の差に基づいて計算することができる。

【0434】

RNAを含む輸送ビヒクル組成物の場合、QUANT-IT（商標）RIBOGREEN（登録商標）RNAアッセイ（Invitrogen Corporation Carlsbad, CA）を使用して、輸送ビヒクル組成物によるRNAの封入を評価することができる。試料を、TE緩衝液（ 10mM トリス-HCl、 1mM EDTA、 $\text{pH} 7.5$ ）中およそ約 $5\mu\text{g/mL}$ の濃度まで希釈する。 $50\mu\text{L}$ の希釈試料を、ポリスチレン96ウェルプレートに移し、 $50\mu\text{L}$ のTE緩衝液または $50\mu\text{L}$ の 2% Triton X-100溶液のいずれかをウェルに加える。プレートを、 37°C の温度にて15分間インキュベートする。RIBOGREEN（登録商標）試薬を、 $1:100$ でTE緩衝液に希釈し、 $100\mu\text{L}$ のこの溶液を各ウェルに加える。蛍光強度は、蛍光プレートリーダー

(Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA) を使用して、励起波長、例えば、約 480 nm 及び発光波長、例えば、約 520 nm にて測定することができる。試薬ブランクの蛍光値を試料の各値から引き、遊離 RNA のパーセンテージを、インタクトな試料 (Triton X-100 を添加しない) の蛍光強度を破壊試料 (Triton X-100 の添加によって生じる) の蛍光値で除することで決定する。

【0435】

実施例 26

T 細胞標的化

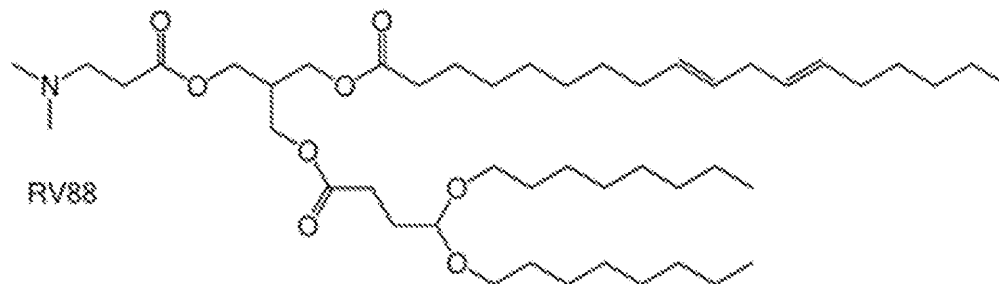
輸送ビヒクルを T 細胞に標的するために、T 細胞抗原結合剤、例えば、抗 CD8 抗体を、輸送ビヒクルの表面にカップリングする。抗 T 細胞抗原抗体は、PBS 中の EDTA の存在下で過剰な DTT により穏やかに還元され、遊離ヒンジ領域チオールを露出させる。DTT を除去するために、抗体を、脱塩カラムに通過させる。ヘテロニ官能性クロスリンカー SM (PEG) 24 を使用して、抗体を、circRNA をロードした輸送ビヒクルの表面に係留する (アミン基は、PEG 脂質の頭部基に存在し、抗体上の遊離チオール基は、DTT によって作製され、SM (PEG) 24 は、アミン及びチオール基間で架橋する)。輸送ビヒクルを最初に過剰の SM (PEG) 24 とインキュベートし、遠心分離して、未反応のクロスリンカーを除去する。次に、活性化された輸送ビヒクルを、過剰の還元型抗 T 細胞抗原抗体とインキュベートする。未結合抗体は、遠心濾過デバイスを使用して除去する。

【0436】

実施例 27

RV88 を使用する RNA 含有輸送ビヒクル。

この実施例では、RNA 含有輸送ビヒクルを、circRNA の送達のためにカチオン性脂質 RV88 を含む 2-D ボルテックスマイクロ流体チップを使用して合成する。



【0437】

(表 14)

物質及び機器	ベンダー	カタログ番号
1Mトリス-HCl、pH 8.0、滅菌	Teknova	T1080
5M塩化ナトリウム溶液	Teknova	S0250
Q Bクエン酸緩衝液、pH 6.0 (100 mM)	Teknova	Q2446
ヌクレアーゼフリー水	Ambion	AM9937
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100ML
RV88	GVK bio	
DSPC	Lipoid	556500
コレステロール	Sigma	C3045-5G
PEG2K	Avanti Polar Lipids	880150
エタノール	Acros Organic	615090010
5 mL ホウケイ酸ガラスバイアル		
	Thermo Scientific	ST5-20
PD MiniTrap G-25 脱塩カラム	GE Healthcare	VWR カタログ番号 95055-984
Quant-iT RiboGreen RNA アッセイキット	Molecular Probes/ Life Technologies	R11490
黒色 96 ウェルマイクロプレート	Greiner	655900

【0438】

RV88、DSPC、及びコレステロールを全て、ホウケイ酸バイアル中10 mg/mLの濃度にてエタノール中で調製する。脂質14:0-PEG2K PEは、ホウケイ酸ガラスバイアル中4 mg/mLの濃度にて調製する。ストック濃度での脂質の溶解は、エタノール中で脂質を2分間超音波処理することによって達成される。次に、溶液を、1700 rpmに設定したオービタル傾斜シェーカー上で、37℃にて10分間加熱する。次に、バイアルを26℃にて最低45分間平衡化する。次に、脂質を、表15に示すように、ある容量のストック脂質を加えることによって混合する。次に、溶液をエタノールで調整して、最終脂質濃度を7.92 mg/mLとした。

【0439】

(表15)

組成物	分子量	%	ナノモル	mg	ストック (mg/ml)	μl	エタノール (μl)
RV88	794.2	40%	7200	5.72	10	571.8	155.3
DSPC	790.15	10%	1800	1.42	10	142.2	
コレステロール	386.67	48%	8640	3.34	10	334.1	
PEG2K	2693.3	2%	360	0.97	4	242.4	

【0440】

RNAを、pH 6.0の75 mMクエン酸緩衝液を用いて、RNAの濃度は1.250 mg/mLで、ストック溶液として調製する。次に、RNAの濃度を、pH 6.0の75 mMクエン酸緩衝液を用いて0.1037 mg/mLに調整し、26℃に平衡化する。次

に、溶液を、26℃にて最低25分間インキュベートする。

【0441】

マイクロ流体チャンバーを、エタノールで洗浄し、neMYSISシリンジポンプを、シリンジにRNA溶液をロードし、別のシリンジにエタノール脂質をロードすることによって調製する。両方のシリンジはロードされ、neMESYSソフトウェアの制御下にある。次に、溶液を、2の水相対有機相比率で、22ml/分の総流速（RNAに関しては14.67ml/分及び脂質溶液に関しては7.33ml/分で、混合チップに適用する。両方のポンプを同期して起動した。マイクロ流体チップから流出したミキサー溶液は、4×1ml画分で収集し、最初の画分は廃棄物として廃棄する。RNA-リポソームを含有する残りの溶液は、G-25ミニ脱塩カラムを使用して、10mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH7.5に交換する。緩衝液の交換後、物質を、サイズ及びRNA捕捉について、それぞれ、DLS分析及びRibogreenアッセイを通して特徴評価する。

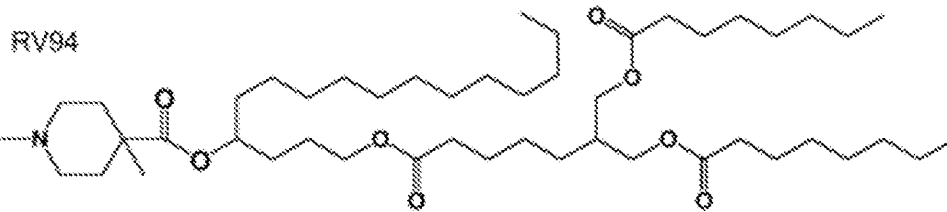
10

【0442】

実施例28

RV94を使用するRNA含有輸送ビヒクル。

この実施例では、RNA含有リポソームを、circRNAの送達のためにカチオン性脂質RV94を含む2-Dボルテックスマイクロ流体チップを使用して合成する。



20

【0443】

(表16)

30

40

50

物質及び機器	ベンダー	カタログ番号
1Mトリス-HCl、pH 8.0、滅菌	Teknova	T1080
5M塩化ナトリウム溶液	Teknova	S0250
Q Bクエン酸緩衝液、pH 6.0 (100 mM)	Teknova	Q2446
ヌクレアーゼフリー水	Ambion	AM9937
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100ML
RV94	GVKbio	
DSPC	Lipoid	556500
コレステロール	Sigma	C3045-5G
PEG2K	Avanti Polar Lipids	880150
エタノール	Acros Organic	615090010
5 mL ホウケイ酸ガラスバイアル	Thermo Scientific	ST5-20
PD MiniTrap G-25 脱塩カラム	GE Healthcare	VWR カタログ番号 95055-984
Quant-iT RiboGreen RNA アッセイキット	Molecular Probes/Life Technologies	R11490
黒色 96 ウェルマイクロプレート	Greiner	655900

【0444】

脂質は、実施例 27 と同様に調製し、表 17 に挙げた物質質量を使用して、最終脂質濃度を 7.92 mg/ml とした。

【0445】

(表 17)

組成物	分子量	%	ナノモル	mg	ストック (mg/ml)	μl	エタノール(μl)
RV94	808.22	40%	2880	2.33	10	232.8	155.3
DSPC	790.15	10%	720	0.57	10	56.9	
コレステロール	386.67	48%	3456	1.34	10	133.6	
PEG2K	2693.3	2%	144	0.39	4	97.0	

【0446】

c i r c RNA の水溶液を、pH 6.0 の 75 mM クエン酸緩衝液を用いて、c i r c RNA は 1.250 mg/ml で、ストック溶液として調製する。次に、RNA の濃度を、pH 6.0 の 75 mM クエン酸緩衝液を用いて 0.1037 mg/ml に調整し、 26°C に平衡化する。次に、溶液を、 26°C にて最低 25 分間インキュベートする。

【0447】

マイクロ流体チャンバーを、エタノールで洗浄し、n e M Y S I S シリンジポンプを、シリンジに RNA 溶液をロードし、別のシリンジにエタノール脂質をロードすることによって調製する。両方のシリンジはロードされ、n e M E S Y S ソフトウェアの制御下にある。次に、溶液を、2 の水相対有機相比率で、 22 ml/分 の総流速 (RNA に関しては 14.67 ml/分 及び脂質溶液に関しては 7.33 ml/分 で、混合チップに適用する

。両方のポンプを同期して起動した。マイクロ流体チップから流出したミキサー溶液は、 $4 \times 1 \text{ mL}$ 画分で収集し、最初の画分は廃棄物として廃棄する。*c i r c R N A* 輸送ビヒクルを含有する残りの溶液は、G-25ミニ脱塩カラムを使用して、上記のように、 10 mM トリス- HCl 、 1 mM EDTA 、 $\text{pH} 7.5$ に交換する。緩衝液の交換後、物質を、サイズ及びRNA捕捉について、それぞれ、DLS分析及びRibogreenアッセイを通して特徴評価する。リポソームの生物物理学的分析を、表18に示す。

【0448】

(表18)

試料名称	<u>N:P</u> 比率	<u>IFR</u>	比率	RNA封入量	RNA 封入収率	サイズ	
		$\text{mL} / \text{分}$	(水/ 有機相)	($\mu\text{g/mL}$)	%	d.nm	PDI
SAM-RV94	8	22	2	31,46	86,9	113,1	0,12

【0449】

実施例29

インライン混合の一般的プロトコル。

個々及び別個のストック溶液を調製する—1つは脂質を含有し、他方は*c i r c R N A*を含有する。所望の脂質または脂質混合物、DSPC、コレステロール及びPEG脂質を含有する脂質ストックを、90%エタノールに可溶化することによって調製する。残りの10%は、低pHクエン酸緩衝液である。脂質ストックの濃度は、 4 mg/mL である。このクエン酸緩衝液のpHは、採用する脂質の種類に応じて、pH3及びpH5間の範囲であることができる。*c i r c R N A*も、 4 mg/mL の濃度にてクエン酸緩衝液に可溶化する。5mLの各ストック溶液を調製する。

【0450】

*c i r c R N A*と組み合わせる前、ストック溶液は完全に透明であり、脂質は完全に可溶化されることが確認されている。ストック溶液を加熱して、脂質を完全に可溶化し得る。このプロセスで使用される*c i r c R N A*は、未修飾または修飾オリゴヌクレオチドであってよく、コレステロールなどの親油性部分とコンジュゲートし得る。

【0451】

個々のストックは、各溶液をTジャンクションにポンプで送り込むことによって組み合わせられる。デュアルヘッドのWatson-Marlowポンプを使用して、2つのストリームの開始と停止を同時に制御した。1.6mmポリプロピレンチューブを、線流速を増加させるために、0.8mmチューブにさらにサイズを小さくする。ポリプロピレンライン(ID=0.8mm)を、Tジャンクションのいずれかの側に取り付ける。ポリプロピレンTは、1.6mmの線状先端を有して、 4.1 mm^3 の容量を結果得る。ポリプロピレンラインの大きい端(1.6mm)の各々を、可溶化脂質ストックまたは可溶化*c i r c R N A*のいずれかを含有する試験管の中に入れる。Tジャンクションの後に、組み合わせられたストリームが流れ出る単一のチューブを配置する。次に、チューブを、2×容量のPBSを含有する容器に伸ばし入れ、これを急速攪拌する。ポンプの流速は、 300 rpm または $110 \text{ mL} / \text{分}$ の設定とする。エタノールを除去し、透析によってPBSに交換する。次に、脂質製剤を、遠心分離またはダイアフィルトレーションを使用して、適切な作業濃度に濃縮する。

【0452】

C57BL/6マウス(Charles River Labs, MA)に、尾静脈注射を介して生理食塩水または製剤化された*c i r c R N A*のいずれかを与える。投与後のさ

まざまな時点で、血清試料を後眼窩採血によって収集する。第VII因子タンパク質の血清レベルは、発色アッセイ (Biophen FVTI, Aniara Corporation, OH) を使用して試料中で決定する。第VII因子の肝臓RNAレベルを決定するために、動物を犠牲にし、肝臓を採取して液体窒素で瞬間凍結する。組織溶解物を、凍結組織から調製し、第VII因子の肝臓RNAレベルを分岐DNAアッセイ (Quant i Gene Assay, Panomics, CA) を使用して定量化する。

【0453】

FVII活性を、C57BL/6マウスにおける静脈内 (ボラス) 注射から48時間後に、FVTI siRNA処理動物において評価する。FVIIは、マイクロプレートスケールで、製造元の指示に従って、血清または組織中のタンパク質レベルを決定するための市販のキットを使用して測定する。FVIIの低下を、未処置対照マウスに対して決定し、結果を残存FVII率 (%) として表す。2つの用量レベル (0.05及び0.005mg/kg FVII siRNA) を、各新規リポソーム組成物のスクリーニングに使用する。

【0454】

実施例30

予形成ベシクルを使用するcircRNA製剤。

カチオン性脂質含有輸送ベシクルを、予形成ベシクル法を使用して作製する。カチオン性脂質、DSPC、コレステロール及びPEG-脂質を、エタノールに、それぞれ、40/10/40/10のモル比にて可溶化する。脂質混合物を、水性緩衝液 (50mMクエン酸塩、pH4) に混合しながら加えて、それぞれ、最終エタノール濃度が30% (容量/容量)、最終脂質濃度が6.1mg/mLになるようにし、室温で2分間平衡化してから押し出す。Nicom analysisによって決定して、ベシクルの直径が70~90nmになるまで、Lipex Extruder (Northern Lipids, Vancouver, BC) を使用して、22℃にて、ポアサイズ80nmのフィルター (Nucleopore) を2枚積み重ねたものに水和脂質を通して押し出し、取得する。小ベシクルを形成しないカチオン性脂質混合物では、脂質混合物を低pH緩衝液 (50mMクエン酸塩、pH3) で水和させて、DSPC頭部基上のホスフェート基をプロトン化することによって、安定的な70~90nmのベシクルの形成を助ける。

【0455】

FVII circRNA (50mMクエン酸塩に可溶化した、30%エタノールを含むpH4水溶液) を、混合しながら、35℃に予め平衡化したベシクルに、約5mL/分の速度で加える。最終的な標的circRNA/脂質比0.06 (wt/wt) を達成した後、混合物をさらに30分間、35℃にてインキュベートして、ベシクルの再構成及びFVII RNAの封入を可能にする。次に、エタノールを除去し、透析またはタンジェンシャルフローダイアフィルトレーションのいずれかによって、外部緩衝液をPBS (155mM NaCl, 3mM Na2HPO4, 1mM KH2PO4, pH7.5) と置き換える。サイズ排除スピンカラムまたはイオン交換スピンカラムを使用して、非封入RNAを除去した後、封入circRNA対脂質の最終的な比率を決定する。

【0456】

実施例31

相同領域は、前駆体RNA環状化を改善する

操作された環状RNAは、安定性を最適化するように設計されており、線状mRNAよりもタンパク質の発現において比較的効率が高い (R. Wesselhoeft et al., 2018)。この環状RNAは、以下の順序で、5' 相同領域、3' グループイントロンフラグメント、第1のスペーサー、内部リボソーム侵入部位 (IRES)、タンパク質コード領域、第2のスペーサー、5' グループイントロンフラグメント、及び3' 相同領域を含有するベクターから誘導した。

【0457】

両方の相同領域は、順列置換イントロンエクソン法を使用して作製し、これはグアノシ

10

20

30

40

50

ンヌクレオチドまたはヌクレオシド及びMg²⁺の追加のみでRNA環状化を促進するために、T4ファージT_d遺伝子からのものなどの自己スプライシンググループI触媒イントロンを利用する(Petkovic S. and Muller S. (2015) RNA circularization strategies in vivo and in vitro. Nucleic Acids Research. 43, 2454-2465 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。結果として得られる順列置換イントロン-エクソン(PIE)領域は、RNAの5'及び3'末端が共有結合して環状RNAを形成することを可能にする。これらのPIE領域を操作して、完全に互いに補完して「相同領域」を形成する5'及び3'端を有するようにした。9ヌクレオチド長の弱い相同領域及び19ヌクレオチド長の強い相同領域を設計し、RNAfoldを使用して二次構造を予測した(図25)。これらの相同領域の追加により、EMCV IRESを含有し、ガウシアルシフェラーゼをコードするコンストラクトのスプライシング効率が、弱い相同領域で0%から16%に、強い相同領域で48%に増加した。効果的な環状化は、アガロースゲル上のスプライシング産物の存在によって確認した(図26)。比較して、線状mRNAを同じRNase Hで処理した場合、結果には環状化RNAを効果的に分離しなかった2つの産物が含まれる(図27)。

【0458】

構造が独立して折りたたまれて環状RNAを形成することを確認するために、2つのスペーサー領域を含んだ(図28)。これらのスペーサー配列は、(1)非構造化、ならびに近位イントロン及びIRES配列に非相同である；(2)イントロン及びIRES二次構造を分離して、それぞれが互いに独立して折りたたむことを可能にする；ならびに(3)保護されたスプライシングバブルの形成を可能にするスペーサー-スペーサー相補性の領域を含有するように、確立された(図30)。スプライシングを可能にするスペーサー配列の追加により、スプライシング効率が46から87%に増加する一方で、破壊的スペーサー配列は、スプライシングを完全に無効にする(図29)。前駆体RNAを、相同領域、スペーサー、EMCV IRES、及びコード領域で試験した場合、配列は環状化を達成した。

【0459】

実施例32

操作された環状RNAは、線状RNAよりも安定性が高い

環状RNAの安定性は、HPLC精製した操作された環状RNAを使用して決定した(A. Wesselhoeft, 2018)。環状RNAは、ガウシアルシフェラーゼをコードする環状RNA(CVB3-GLuc-pAC)とした。標準的な未修飾5'メチルグアノシンキャップ及び3'ポリAテール線状GLuc mRNA、ならびにヌクレオシド修飾(シュドウリジン、5-メチルシトシン)線状GLuc mRNAは、環状コンストラクトに対する線状比較とした。発光を、HEK293細胞及びHeLa細胞の上清で行って24時間トランスフェクションし、次にGLuc活性について6日間毎日継続的にモニターした。外因性環状RNAは、24時間のトランスフェクション後に、線状未修飾mRNAよりも811.2%多くのタンパク質を産生した(図31)。24時間以内で、環状RNAはまた、修飾線状mRNAよりも54.5%多くのタンパク質を産生した(図31)。6日間の間に、HEK293細胞の環状RNAは、80時間のタンパク質産生半減期を呈した一方で、未修飾及び修飾線状mRNAはそれぞれ43時間及び45時間の半減期を示した(図32)。環状RNAはタンパク質の産生が多く、タンパク質産生の半減期が長いので、環状RNAは線状mRNAよりも安定性が高い。

【0460】

実施例33

CARをコードする環状RNAの精製は、免疫原性の効果的な除去を促進する

操作された環状RNAを使用して、前駆体RNA分子からの翻訳からのさらなる精製ステップは、免疫原性を減少させる(R. Wesselhoeft et al., 2019)。スプライシング反応中の最適な精製には、RNase R、高速液体クロマトグラフ

イー（HPLC）、オリゴヌクレオチドを標的としたRNAse Hによる消化、及び残留三リン酸を除去するためのホスファターゼが含まれる。環状RNAの免疫原性の有効性、2つの細胞株（ヒト胚性腎臓、293；ヒト肺癌、A549）を、コクサッキーウイルスB3内部リボソーム侵入部位（CVB3 IRES）、タンパク質コーディングメッセージ、2つの設計されたスパーサー配列、PIEコンストラクトからの2つの短いエクソンフラグメント、ならびに順列置換アナベナプレトRNAグループイントロンの3'及び5'イントロンセグメントを含有する環状RNA前駆体における細胞生存率及びCAR発現安定応答の差異について観察する（図33）。ヒト肺癌細胞株の処理では、個別のRNAse R及びHPLCでは、インターロイキン-6（IL-6）のサイトカイン放出を低下させるのに十分でなく（図34）、インターフェロン- α 1（IFN- α 1）の有意な増加にさらにつながる。HPLC後及びRNAse消化前のホスファターゼ処理は、未精製環状RNAと比較して、細胞生存率の増加、正規化GLuc活性の増加、ならびに検出不可能なまたはトランスフェクトされていないベースラインレベルの単球化学誘引物質タンパク質1（MCP1）、IL-6、IF- α 、腫瘍壊死因子 α （TNF- α ）、及びIFN- γ 誘導性タンパク質-10（IP-10）を示す。

【0461】

実施例34

CARをコードする操作された環状RNAは、トール様受容体分解を回避する

環状RNAは、トール様受容体（TLR）の検出を回避することができる。TLR3、7、及び8が、エンドソーム内のRNAを検出すると、それらはRNAに結合し、炎症反応を引き起こす（T. Kawasaki & T. Kawai, 2014）。イントロン及び相同アーム配列を欠く環状RNAの線状化バージョンを、ホスファターゼ及びHPLCで処理する。TLR3及び8は、RNAが線状ではなく環状である場合、相対的なSEAP活性が大幅に低下することを示す。

【0462】

実施例35

実施例35A—脂質ナノ粒子を通した環状RNA送達は、in Vivoまたはin Vitroでタンパク質の効果的な発現を提供する

LNPは、エタノール中のMC3、DSPC（Avanti Polar Lipids, Alabaster, Ala.）、コレステロール（Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany）、DMG-PEG（NOF, Bouwelven, Belgium）、及びDSPE-PEG（50:10.5:38:1.4:0.5モル比）の1容量の脂質混合物を、酢酸緩衝液中の3容量の環状RNA（1:16w/w環状RNA対脂質）と、マイクロ流体混合デバイスNanoassembler（登録商標）（Precision Nanosystems, Vancouver BC）に、合計流速2mL/分（エタノールに関しては0.5mL/分及び水性緩衝液に関しては1.5mL/分）で注射することを介して混合することにより合成する。結果得られた混合物を、Slide-A-Lyzerカセット（10kDaカットオフ、Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, Ill.）を用いて、一次容量の200倍で、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）（pH7.4）に対して、16時間にわたって2回透析して、エタノールを除去する。結果得られたナノ粒子懸濁液を、0.2 μ m滅菌フィルター（Sarstedt, Numbrecht, Germany）を通してガラスバイアルに濾過し、圧着クロージャーで密封した。

【0463】

製剤の特徴評価

Zetasizer Nano ZS（Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK）を使用して、環状RNAナノ粒子の粒径、多分散性指数（PDI）及びゼータ電位を、粒径の決定においてはPBS、及びゼータ電位の決定においては15mMのPBSで決定する。

【0464】

10

20

30

40

50

紫外可視分光法を使用して、環状RNAナノ粒子製剤の濃度を決定する。LNPを、10対1に、メタノール及びクロロホルム溶液の4:1 (v/v) 混合物に希釈する。混合後、溶液の吸光度スペクトルを、DU 800分光光度計 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, Calif.) で、230 nm~330 nm間で記録する。ナノ粒子製剤中の環状RNAは、その製剤中に使用されている環状RNAの吸光係数に基づいて計算し、260 nm波長の値及び330 nmでのベースライン間の差からベースラインを差し引く。

【0465】

QUANT-IT (商標) RIBOGREEN (登録商標) RNAアッセイ (Invitrogen Corporation Carlsbad, Calif.) を使用して、ナノ粒子による環状RNAの封入を評価する。試料を、製造元の指示に従って調製する。蛍光強度は、蛍光プレートリーダー (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, Mass.) を使用して、約480 nmの励起波長及び約520 nmの発光波長にて測定する。試薬ブランクの蛍光値を試料の各値から引き、遊離環状RNAのパーセンテージを、インタクトな試料 (Triton X-100を添加しない) の蛍光強度を破壊試料 (Triton X-100の添加によって生じる) の蛍光値で除することによって決定する。

【0466】

LNPへの標的化リガンドの付着。

まず、ナノボディを、CD3、CD4、またはCD8への結合能力について選択する。好ましくは、T細胞と結合し、急速な内在化を誘導するが、T細胞を過剰に刺激しないCD3抗体を使用する。ナノボディが選択されると、当業者に公知の技術を使用して部位特異的突然変異誘発を使用して、単一表面露出システインを有するナノボディを生成する。

【0467】

ナノボディは、最初に、反応性システインを介してクリックケミストリーのためにアルキン基にコンジュゲートさせる。アルキン-マレイミドを、選択した還元剤を含まない (DTTまたはBMEなし) ナノボディと、アルキン-マレイミド対ナノボディの10倍モル比で混合することにより、単一の遊離システインを標識する (Hermanson, Bioconjugation techniques, 3rd addition, 2013 (参照により組み込まれる))。遊離アルキンリンカー基を、2×100容量のPBSを用いてアミコンフィルターで透析する。

【0468】

精製されたナノボディアルキンを、DSPE-PEG-アジドと、クリックケミストリー及び触媒としての銅の添加を介して反応させ、Presolski et al (Presolski et al 2011, Current protocols in chemical biology 3:153-162) に記載されている。ナノボディが修飾されると、250 nmのコレステロールを加えて、脂質修飾ナノボディのミセル製剤を産生する。

【0469】

脂質修飾ナノボディミセルをLNPに組み込むには、脂質ナノボディをLNPと48時間、4℃にて、1:1ナノボディ対環状RNA重量の比率にてインキュベートする。ナノボディ標識LNPを、1MDaカットオフ膜 (BioLabs, LTS) を用いて透析を介して遊離ナノボディ脂質から分離する。ナノボディの組み込みは、標準と比較して、ELISAまたはウエスタンブロットを介しても測定される。

【0470】

実施例35B-T細胞への送達のためのポリマーナノ粒子への環状RNAの製剤化。

PBAEポリマー合成

PBAEポリマーは、以前の方法を使用して合成する (Mangraviti et al., ACS Nano 9, 1236-1249 (2015))。簡潔には、1,4-ブタンジオールジアクリレート、4-アミノ-1-ブタノールと1.1:1モル比のジア

10

20

30

40

50

クリレート対アミンモノマーにて組み合わせた。混合後、反応を90℃にて24時間攪拌しながら行って、アクリレート末端ポリ(4-アミノ-1-ブタノール-co-1, 4-ブタンジオールジアクリレート)を産生する。ポリマーを、テトラヒドロフラン(THF) 1mlあたり1.15gの比率で溶解する。ピペラジンキャップ447ポリマーを形成するために、13ml THF中に溶解した786mgの1-(3-アミノプロピル)-4-メチルピペラジンを、ポリマー/THF溶液に加えた。結果得られた混合物を、2時間攪拌しながらインキュベートし、次に5容量のジエチルエーテルで沈殿させる。溶媒をデカントした後、ポリマーを2容量のエーテルで洗浄し、真空下で2日間乾燥させてから、DMSO中100mg/mlのストックを形成するために使用する。ポリマーは、-20℃で保管する。

10

【0471】

PGA-抗体コンジュゲーション。

15kDポリグルタミン酸(Alamanda Polymers製)を20mg/mlとなるように水に溶解し、10分間超音波処理する。等容量の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(Thermo Fisher)の4mg/ml水溶液を加え、5分間室温にて混合する。次に、結果得られた活性化PGAを、抗体と4:1モル比にてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で組み合わせ、6時間室温にて混合した。未連結PGAを除去するために、溶液を、50,000NMWCO膜(Millipore)でPBSに対して3回交換した。抗体濃度は、NanoDrop 2000分光光度計(Thermo Scientific)を使用して決定する。T細胞実験に使用した抗体は、抗CD3(クローンOKT3)、抗CD4(クローンOKT4)、抗CD8(クローンOKT8)及び抗CD28(クローン9.3、いずれもBioXCell製)とした。クローンC1.18.4を、対照抗体として使用する。HSC形質導入には、ポリクローナルヤギ抗マウスIgG及びポリクローナルヤギ抗マウスCD105抗体(Fisher)を使用する。

20

【0472】

ナノ粒子(NP)調製

環状RNAストックを、100µg/mlまで、滅菌、ヌクレアーゼフリー25mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.2(NaOAc)に希釈する。PBAE-447ポリマーを含むDMSOを、6mg/mlまでNaOAcに希釈し、環状RNAに60:1(w:w)比にて加える。この混合物を15秒間ボルテックスし、5分間室温にてインキュベートして、NPを形成する。ナノ粒子にターゲティングエレメントを追加するために、PGA連結抗体を、250µg/mlまでNaOAcに希釈し、2.5:1(w:w)比にて環状RNAに加える。この混合物を15秒間ボルテックスし、5分間室温にてインキュベートして、PGA抗体に被覆されたNPを形成する。PGA-PEG及び他のブロッキング剤も混合して、血清中での半減期が長いNP粒子を生成できる。

30

【0473】

ナノ粒子を、凍結保護剤として60mg/mlのD-スクロースと混合し、液体窒素で瞬間凍結させてから、Free Zone 2.5L凍結乾燥システム(Labconco)で処理することにより、凍結乾燥した。凍結乾燥したNPは、使用時まで-80℃で保管する。利用時には、凍結乾燥したNPをある容量の滅菌水に再懸濁し、元の濃度に戻した。

40

【0474】

実施例36

インビトロでの細胞へのCAR環状RNAの導入

環状RNAは、脂質ポリマー転スフェクション試薬を使用して真核細胞の細胞質に導入することができる。例えば、100ngのcircRNAを含む<5µLの水または保存緩衝液(pH5~7)を、OptiMem(Gibco)と混合して、最終容量を5µLにすることができる。これとは別に、0.2µLのMessengerMax転スフェクション試薬(Thermo Fisher)を、OptiMem(Gibco)

50

と混合して最終容量を5 μ Lにすることができる。次に、この2番目の混合物を最初の混合物に加えて、c i r c R N A、O p t i M e m、及びM e s s e n g e r M a xトランスフェクション試薬の混合物を産生する。これを、次にc i r c R N Aの細胞内在化を促進するために、短いインキュベーション（5～30分間）後に10,000～50,000個の真核細胞の培養培地に加えることができる。あるいは、c i r c R N Aを、例えば、N e o nエレクトロポレーションシステム（T h e r m o F i s h e r）を使用して真核細胞へとエレクトロポレーションすることができる。1 μ gのc i r c R N Aを、最大100 μ Lの容量にて、1,600 V、10 ms、3パルスにて200,000個のT細胞へとエレクトロポレーションすることができる。あるいは、c i r c R N Aを、c i r c R N Aと複合体を形成した脂質ナノ粒子またはポリマーを使用して真核細胞へと導入することができる。

10

【0475】

実施例37

環状RNAで形質導入されたT細胞上でのCARの発現

CARをコードする操作された環状RNAを、脂質ナノ粒子によってT細胞に送達し、CAR発現T細胞を生成する。翻訳の効率を決定するために、操作された環状RNAはCARコード領域を含む。次に、T細胞を、CARをコードするc i r c R N Aでトランスフェクトする。次に、フローサイトメトリーを使用して、細胞表面上でのCAR発現を分析する（S. De Olivera et al., 2013）。フルオレセインイソチオシアネートコンジュゲートポリクローナルF（A b '）2フラグメントヤギ抗ヒトIgG1 Fc γ （J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s, W e s t G r o v e, P A）（55.5 ng/105個の細胞）を使用して、細胞表面上に位置するCARコンストラクト内のヒトIgGスペーサーの存在を検出する。J u r k a t細胞を、CD19-CARで安定して形質導入し、対照T細胞と比較して96%を超える発現率を示す。CAR発現T細胞を、PBSでさらに洗浄する。フローサイトメーターの結果は、T細胞によるCARの発現を示す。

20

【0476】

実施例38

実施例38A-CARをコードするc i r c R N Aのトランスフェクションは、T細胞からの最小限のサイトカイン放出をもたらす

30

CARを発現するように操作された環状RNAを使用すると、レンチウイルスを使用した場合よりもサイトカイン放出が少なくなる。遺伝子療法においてベクターとしてレンチウイルスを使用することの主な欠点の1つは、不安定なパッケージング細胞またはカスケードする細胞傷害性効果をもたらすHIVのgagもしくはpol遺伝子の発現に起因するサイトカイン放出である（O. Merten, 2016）。環状RNAを使用して生成されたCAR形質導入T細胞は、CARのレンチウイルス送達と比較して、サイトカインをほとんどまたはまったく放出しない。

【0477】

サイトカイン放出は、サイトカイン放出アッセイを通して決定することができる。例えば、CRAは、治療用mAbを使用して行う（S. Vessillier et al., 2015）。精製されたヒトIgG4 κ 及びIgG1を、アイソタイプ対照（A M S B i o t e c h n o l o g y L t d, U K）として使用し、抗CD28アゴニスト（B i o l e g e n d, U K）を、CD28スーパーアゴニストに対する特異性を評価するための対照として使用する。アジ化ナトリウムを、対照mAbから、A m i c o n（登録商標）U l t r a - 4遠心式フィルターユニット（M i l l i p o r e L t d, U K）を使用して除去し、リムルスアメーバ細胞溶解物ゲル凝固試験を使用してエンドトキシンフリーであることを確認する。ヒトFc γ RI及びFc γ RIIIaがヒトIgG1と同様にマウスIgG2aと結合するため、ムロモナブ-CD3応答を、ヒトIgG1アイソタイプ対照と比較する。10 μ g mL⁻¹のフィトヘマグルチニン（PHA; S i g m a - A l d r i c h L t d, U K）を、陽性対照として使用する。P B M C S P C R Aを

40

50

、マイクロタイタープレートのウェルを $1\mu\text{g}$ ウェル -1 のmAb濃度にて1時間ウェットコーティングし、続いて洗浄して未結合mAbを除去し、次にPBMCを48時間加えることによって行う(Eastwood et al., 2010, Eastwood et al., 2013)。PBMC HDC CRAは、mAbを $1\mu\text{g ml}^{-1}$ にて、高密度で48時間プレインキュベートしたPBMCに加え、24時間刺激することによって行う(Romer et al., 2011, Bartholomaeus et al., 2014)。WB及び10% (v/v) WB CRAは、 $5\mu\text{g ml}^{-1}$ のmAb濃度及び48時間刺激で、前述のように行う(Wolf et al., 2012, Bailey et al., 2013)。全ての濃度は、これらの方法を使用したサイトカイン放出に関する以前に公開された知見との比較性のために選択する。公開されている方法ではないが、WB SP及び10% (v/v) WB SP CRAは、対照として $1\mu\text{g}$ ウェル -1 のmAbコーティング濃度を用いてPBMC SP CRAと同様に行う。全てのアッセイは、96ウェル丸底マイクロタイタープレート(Sigma Aldrich Ltd)で実施し、PBMC SP及びHDC CRAは、ウェルあたり $200\mu\text{l}$ の完全培地中 2×10^5 個のPBMCを利用し、WB CRAは、 $0.7\sim 2.0\times 10^6$ 個のWBCを含有するウェルあたり $200\mu\text{l}$ のWBを利用し、10% (v/v) WB CRAは、後者の10分の1を完全培地で $200\mu\text{l}$ ウェル -1 にて利用した。CRAの比較は、同じセットのドナーを使用して行うが、例外としてPBMC HDC CRAは、異なるセットの8ドナーを利用する。ヘパリン化WBからのRBCの選択的枯渇の影響を評価する、これにはEasy Sep (商標) グリコホリンA陽性細胞枯渇カクテル(Stemcell Technologies, UK)を製造元の指示に従って使用する。バフィーコートは、遠心分離によって全血から調製し、抗グリコホリンA試薬と15分間室温にてインキュベートしてから、磁性ナノ粒子を加え、10分間さらにインキュベートする。次に、RBCを、免疫磁気分離によって除去する。RBCの95~99%の枯渇は、視覚的評価によって確認する。結果得られた白血球(WBC)懸濁液は、ほぼ完全に、血漿が枯渇した多形核白血球、リンパ球及び単球からなり、完全培地中 $1\times 10^6\text{ml}^{-1}$ に調整し、WBC SP CRAにおいて $200\mu\text{l}$ ウェル -1 、及び $1\mu\text{g}$ ウェル -1 TGN1412のmAbコーティング濃度にて使用する。TGN1412関連サイトカイン放出の阻害を調査するために、WBCを自己WBに再懸濁する、または $10\sim 200\mu\text{g}$ ウェル -1 のGYPA(Sigma-Aldrich Ltd)を加える。TGN1412関連サイトカイン放出に対するIL-2の効果を評価するために、ダクリズマブ(IL-2Rアンタゴニスト)を $5\mu\text{g ml}^{-1}$ の濃度にて細胞に加え、10分間プレインキュベートした後に、上記のPBMC SP CRAにプレーティングする。培養上清中のIFN γ 、IL-2、IL-13及びIL-8の濃度を、カスタムメイドのMSDプレートを、製造元の指示(Meso Scale Discovery, USA)に従って使用して、測定する。TNF α 及びIL-17濃度は、前述のようにELISAによって定量化する(Eastwood et al., 2010, Eastwood et al., 2013)。

【0478】

サイトカイン放出アッセイを、レンチウイルスを使用してならびにCAR形質導入T細胞の確立において操作された環状RNAを使用して操作されたT細胞に関して完了する。T細胞操作環状RNAは、有意に少ないサイトカインを産生する。

【0479】

実施例38B—操作された環状RNAに由来するCAR形質導入T細胞は腫瘍細胞を死滅させる

操作された環状RNAを使用して作製されたCAR形質導入T細胞は、腫瘍細胞を死滅させることができる。ヒトIL-3、SCF、及びGM-CSFのトランスジェニックである新生児マウスに、胎児肝臓CD34+または他の造血幹細胞を注射して、ヒト化免疫系(HIS)マウスを作製する。5~6週間後、ヒト造血の生着を確認する。次に、死滅アッセイを行って、これらのCAR形質導入T細胞の有効性を決定する。例えば、UPN035は初代CD3+及びCD8+T細胞のオリゴクローナル集団であり、これを、CD

19+標的細胞の特異的細胞溶解を指示するキメラScFv免疫受容体を発現するようにトランスフェクトする(L. Cao et al, "Development and application of a multiplexable flow-cytometry-based assay to quantify cell-mediated cytotoxicity," Cytometry Part A 77A(6):534-545(2010))。4-h51Cr放出アッセイを行う、例えば、この場合、90~95%のコンフルエントなU251T細胞を、一晚ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)溶液にてNa51CrO4で標識する(C. Brown et al., "Biophotonic cytotoxicity assay for high-throughput screening of cytolytic killing," J. Immunol. Methods 297(1-2):39-52(2005))。翌日、U251T細胞をEDTA溶液で洗浄し、チルプシン処理し、DMEMに再懸濁し、60分間37℃にてインキュベートした後、DMEMで再度洗浄する。標的細胞を、5% CO2で37℃にてV底96ウェルマイクロプレートにおいて漸増数のCD8+エフェクターCTLと共培養する。1~4時間後、上清の50%を除去し、放出された51Crを、Cobra IIオートガンマ(Packard)で計数する。溶解率(%)は、1% SDSに標的細胞をプレーティングすることによって決定された100%溶解対照、ならびにエフェクター細胞を含まない培地に標的細胞をプレーティングすることによって決定された0%溶解対照と比較した合計陽性スコアに基づいて計算する。CAR形質導入T細胞は、腫瘍細胞を効果的に死滅させる。

【0480】

実施例38C-操作された環状RNAに由来するCAR形質導入T細胞は腫瘍細胞を死滅させる

血液癌系を、ルシフェラーゼ発現Eu-ALL01白血病細胞を4~6週齢の雌アルビノC57BL/6J-Tyrマウスに注射することによって産生する。注射から1週間後、マウスを、3つの群に無作為化する。群1のマウスは、eGFPを発現する環状RNAを含有する対照ナノ粒子製剤で処置する。群2のマウスは、CD19特異的CARをコードする環状RNAを含有する試験ナノ粒子製剤で処置する。群3のマウスは、CD19特異的CARをコードする線状修飾RNAを含有する試験ナノ粒子製剤で処置する。

【0481】

時間が経過すると、ルシフェラーゼ発現白血病は、D-ルシフェリンを静脈内投与することによってマウスにおいて検出され、マウスを、D-ルシフェリンの注射10分後にXenogen IVISスペクトルイメージングシステム(Xenogen)で撮像する。群1のマウスは、急速な白血病の拡散を示す。群2のマウスは、群3のマウスと比較して、早い時点及び遅い時点で、低減した白血病の発光量を示す。群3のマウスは、群2のマウスよりも早く白血病のリバウンド及び癌細胞数における増加を示し、これは、環状RNAコンストラクトと比較して線状修飾RNAコンストラクトの安定性が低いためである。

【0482】

実施例39

TCR複合体タンパク質発現の検出

ナノ粒子またはエレクトロポレーションを使用してTCR複合体タンパク質をコードする環状RNAを送達した後、TCR複合体タンパク質の発現をフローサイトメトリーにより確認する。TCR複合体タンパク質は、適切な抗標的抗体を使用することによって検出され得る(例えば、CD19特異的TCR複合体タンパク質の発現は、抗CD19 scFv抗体を用いて検出され得る)。T細胞を、染色緩衝液で洗浄し、PBSに再懸濁する。死細胞を排除するために、細胞を、例えば、LIVE/DEAD(登録商標)Fixable Aqua Dead Cell Stain(Invitrogen)と、30分間氷上でインキュベートする。細胞をPBSで洗浄し、染色緩衝液に再懸濁する。FACS緩衝液を各チューブに加え、細胞を遠心分離によりペレット化する。TCR複合体タンパク質の表面発現を、例えば、Zenon(登録商標)R-フィコエリトリン標識ヒト抗

腫瘍抗原 I g G 1 F c または腫瘍抗原 - F c によって検出する。抗体または可溶性腫瘍抗原を、それぞれの試料に加え、インキュベートする。次に細胞を洗浄し、T細胞を表面マーカーに関して染色する。

【0483】

実施例 40

In Vivo 固形腫瘍異種移植マウスモデルにおける組換え T C R 複合体タンパク質発現 T 細胞処置

操作された環状 RNA を使用して作製された組換え T C R を発現する T 細胞。初代ヒト固形腫瘍細胞を、免疫低下状態のマウスにおいて成長させる。例示的な固形癌細胞には、The Cancer Genome Atlas (TCGA) 及び／または the Broad Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE、Barretina et al., Nature 483:603 (2012) を参照されたい) で提供されるような固形腫瘍細胞株が含まれる。例示的な固形癌細胞には、肺癌、卵巣癌、黒色腫、結腸癌、胃癌、腎細胞癌、食道癌、神経膠腫、尿路上皮癌、網膜芽細胞腫、乳癌、非ホジキンリンパ腫、脾臓癌、ホジキンリンパ腫、骨髄腫、肝細胞癌、白血病、子宮頸癌、胆管癌、口腔癌、頭頸部癌、または中皮腫から単離された原発腫瘍細胞が含まれる。これらのマウスを使用して、ヒト腫瘍異種移植モデルにおいて組換え T C R 複合体タンパク質を発現する T 細胞の有効性を試験する。 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個の腫瘍細胞を皮下に移植または注射した後、腫瘍を $200 \sim 500 \text{ mm}^3$ まで成長させてから、処置を開始する。次に、組換え T C R を発現する T 細胞を、マウスに導入する。本発明の T C R 複合体タンパク質を含むヒト T 細胞を用いた処置に応答した腫瘍収縮は、腫瘍サイズのキャリパー測定によって、または f f l u c 発現腫瘍細胞によって放出されるルシフェラーゼタンパク質 (f f l u c) シグナルの強度を追跡することによって評価することができる。

【0484】

実施例 41

環状 RNA を使用して C A R 発現を操作すると、レンチウイルスと比較してサイトカイン放出症候群が少なくなる

操作された環状 RNA を使用して C A R 発現を生成すると、レンチウイルスをベクターとして使用する場合よりも、サイトカイン放出症候群を受けにくくなる。C D 19 特異的 C A R を発現するように操作された細胞を、レンチウイルスを使用して C D 19 特異的 C A R を発現するように操作された細胞と比較する。各タイプのベクターを、T細胞へとトランスフェクトし、これを次に C D 19 を発現する細胞株も投与されているマウスに送達する。マウスによる I L - 6 発現を、E L I S A によって経時的にモニターする。環状 RNA を使用して生成された C A R - T 細胞を投与されたマウスは、レンチウイルスを使用して生成された C A R - T 細胞を投与されたマウスよりも I L - 6 の産生が少ない。

【0485】

実施例 42

実施例 42 A - 環状 RNA を使用して産生された C A R 発現 T 細胞は、修飾 mRNA を使用して産生された C A R 発現 T 細胞よりも長い機能的死滅をインビトロで呈する。

E μ - A L L O 1 白血病細胞 (または対照として B 16 F 10 黒色腫腫瘍細胞) を膜色素 P K H - 26 (Sigma-Aldrich) で標識し、10%胎児子牛血清を含有する R P M I で洗浄し、同じ培地に 1×10^5 個の腫瘍細胞 / m l の濃度で再懸濁する。C D 19 標的 C A R をコードする環状 RNA C A R - T コンストラクトまたは C D 19 標的 C A R をコードする修飾 mRNA コンストラクトのいずれかでトランスフェクトされている T 細胞を、懸濁液に、さまざまなエフェクター対標的細胞比にて 96 ウェルプレートにて加え (最終容量、 $200 \mu\text{L}$)、3 時間、 37°C にてインキュベートする。細胞を、V 底 96 ウェルプレートに移す。形質導入された T 細胞を、形質導入後 1、2、3、4、6、8、及び 10 日目に C D 19 発現 E μ - A L L O 1 白血病細胞を死滅させる能力に関して試験する。環状 RNA を使用して産生された C A R 発現 T 細胞は、修飾 mRNA を使

用して産生されたCAR発現T細胞と比較して、CD19発現細胞の細胞死滅においてより長く機能する。

【0486】

実施例42B—環状RNAを使用して産生されたCAR発現T細胞は、修飾mRNAを使用して産生されたCAR発現T細胞よりも長いサイトカイン分泌をインビトロで呈する。

CAR-T細胞を、CD19特異的CARをコードする環状RNAまたはCD19特異的CARをコードする修飾mRNAのいずれかを形質導入することによって産生する。T細胞サイトカイン放出を、ELISA (R&D Systems) を用いて、照射されたEμ-ALL01白血病細胞またはB16F10黒色腫対照への刺激後24時間 (IL-2) または48時間 (IFN-γ及びTNF-α) で測定する。T細胞を刺激し、形質導入後1、2、3、4、6、8、10日目にサイトカイン放出に関して試験して、環状RNAを使用して生成されたCAR-T細胞が、修飾mRNAを使用して生成されたCAR-T細胞と比較して、より多くのサイトカインをより長い期間産生することを示す。

【0487】

さらに、CD19 CARコンストラクトの発現を、CAR-T形質導入細胞を可溶性CD19蛍光標識タンパク質で標識することによって測定する。次に、細胞を培地中で洗浄し、フローサイトメトリーを使用して、CD19 CARの機能的発現を評価する。環状RNAを形質導入したCD19 CAR細胞は、修飾mRNAを形質導入したT細胞と比較して、後の時点でより長く機能的発現を示す。

【0488】

実施例43

CARをコードするcircRNAを用いた初代ヒトT細胞のエレクトロポレーション
4人の異なるドナーから単離された150,000個の初代ヒトT細胞を、アナベナイントロン／エクソン領域、抗CD19 CAR発現配列、及びCVB3 IRESを有する250ngのcircRNAでエレクトロポレーションした。24時間のインキュベーション後、細胞を、当業者に公知の標準的な技術及び試薬を使用するフローサイトメトリー分析によって、抗CD19 CARの表面発現に関して分析した。

【0489】

図36及び37に示すように、初代ヒトT細胞をエレクトロポレーションして、生存T細胞集団で有意な表面CAR発現を達成することができる。

【0490】

実施例44

CD19+標的細胞に対するcircRNA CAR T細胞の有効性

アナベナイントロン／エクソン領域、及び抗CD19 CAR発現配列を含むコンストラクトを環状化した。150,000個のヒト初代CD3+T細胞を、モックエレクトロポレーションしたまたはCD19に対するCARをコードする250ng circRNAでエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションから1日後、10,000個のT細胞を、ホタルルシフェラーゼを安定して発現する10,000個の標的細胞または非標的細胞と24時間共培養した。残存するDauidiもしくはNaIm6標的細胞、またはK562非標的細胞の定量化を、ホタル発光の検出によって決定した (図38)。

【0491】

実施例45

実施例45A—エレクトロポレーションから5日後の異なるIRES配列を有するcircRNA CAR T細胞の有効性

アナベナイントロン／エクソン領域、抗CD19 CAR発現配列、及びCVB3 IRESまたはサリウイルスSZ1 IRESを含むコンストラクトを環状化した。150,000個のヒト初代CD3+T細胞を、モックエレクトロポレーションした、または250ng circRNAでエレクトロポレーションした。10,000個の細胞を、共培養実験のために播種した。エレクトロポレーションから5日後、ホタルルシフェラーゼを安定して発現する10,000個のRajiまたはK562細胞を、播種されたT細胞と

24時間共培養した。特異的溶解は、 $(1 - [\text{CAR条件発光}] / [\text{モック条件発光}]) \times 100$ として定義した(図39A)。

【0492】

実施例45B—エレクトロポレーションから1日後の*circRNA* CAR T細胞の有効性

アナベナイントロン／エクソン領域、抗CD19 CAR発現配列、及びCVB3 IRESを含むコンストラクトを環状化した。4人の異なるドナーからの150,000個のヒト初代CD3+T細胞を、モックエレクトロポレーションしたまたは250ng *circRNA*でエレクトロポレーションした。10,000個の細胞を、共培養実験のために播種した。エレクトロポレーションから1日後、ホタルルシフェラーゼを安定して発現する10,000個のRaji(標的)またはK562(非標的)細胞を、播種されたT細胞と24時間共培養した。特異的溶解は、 $(1 - [\text{CAR条件発光}] / [\text{モック条件発光}]) \times 100$ として定義した(図39B)。

【0493】

実施例46

実施例46A—*circRNA* CAR T細胞の溶解速度論

アナベナイントロン／エクソン領域、抗CD19 CAR発現配列、及びCVB3 IRESまたはサリウイルスSZ1 IRESを含むコンストラクトを環状化した。ヒト初代CD3+T細胞を、150ngまたは250ngの*circRNA*で48時間かけてエレクトロポレーションした。Raji-lucオンターゲットまたはK562-lucオフターゲット細胞を、修飾CD3+T細胞と1:1比率にて共培養した。Raji-luc及びK562-luc細胞の発光を測定した(図40A)。

【0494】

実施例46B—*circRNA* CAR T細胞の溶解速度論

K562標的細胞の特異的溶解の定量化は、ホタル発光の検出によって決定した。150,000個のヒト初代CD3+T細胞を、モックエレクトロポレーションした、または250ng *circRNA*でエレクトロポレーションした。10,000個の細胞を、共培養実験のために播種した。エレクトロポレーションから1日後、ホタルルシフェラーゼを安定して発現する2,000、10,000、または50,000個のK562細胞を、播種したT細胞と24時間共培養した。特異的溶解は、 $(1 - [\text{CAR条件発光}] / [\text{モック条件発光}]) \times 100$ として定義した(図40B)。

【0495】

実施例46C—*circRNA* CAR T細胞の溶解速度論に及ぼす共培養比の影響

Raji標的細胞の特異的溶解の定量化は、ホタル発光の検出によって決定した。150,000個のヒト初代CD3+T細胞を、モックエレクトロポレーションした、または250ng *circRNA*でエレクトロポレーションした。10,000個の細胞を、共培養実験のために播種した。エレクトロポレーションから1日後、ホタルルシフェラーゼを安定して発現する2,000、10,000、または50,000個のRaji細胞を、播種したT細胞と24時間共培養した。特異的溶解は、 $(1 - [\text{CAR条件発光}] / [\text{モック条件発光}]) \times 100$ として定義した(図40C)。

【0496】

実施例47

circRNA CAR T細胞と線状CAR RNAでエレクトロポレーションした細胞またはCARレンチウイルスで形質導入した細胞との比較

アナベナイントロン／エクソン領域、抗CD19 CAR発現配列、及びサリウイルスSZ1 IRESを含むコンストラクトを環状化した。CD3+初代ヒトT細胞を、*circRNA*でエレクトロポレーションした、または抗CD19 CARをコードするレンチウイルスに感染させた。インターフェロンガンマ転写産物誘導を、Raji標的細胞を伴うまたは伴わない24時間の培養後に測定した(図41A)。CAR+T細胞の割合も測定した(図41B)。モックエレクトロポレーションした、CD19に対するCARを

10

20

30

40

50

コードする *c i r c R N A* でエレクトロポレーションした、または *C D 19* に対する *C A R* をコードするレンチウイルスに感染させたヒト初代 *C D 3 + T* 細胞による *R a j i* 標的細胞の特異的溶解を測定した（図 4 1 C）。

【 0 4 9 7 】

実施例 4 8

C i r c R N A の安定性

アナベナイントロン／エクソン領域、抗 *C D 19* *C A R* 発現配列、及びサリウイルス *S Z 1 I R E S* を含むコンストラクトを環状化した。*C A R* 表面発現を、抗 *C D 19* *C A R* をコードする *250 ng* の線状 *m R N A* または *c i r c R N A* を用いた *150,000* 個の初代ヒト *C D 3 + T* 細胞のエレクトロポレーションから *1 ~ 5* 日後に測定した。*T* 細胞を、刺激から *5* 日後にエレクトロポレーションした。細胞生存率を、*D A P I* で評価した。生細胞を、*C D 3* 及び *C A R* 発現に関して分析した（図 4 8）。

【 0 4 9 8 】

実施例 4 9

ヒト単球における *C A R* 発現

アナベナイントロン／エクソン領域、及び *C A R* 発現配列を含むコンストラクトを環状化した。*T H P - 1 M 0* 細胞を、モックエレクトロポレーションした、または *C A R* をコードする *250 ng* *c i r c R N A* でエレクトロポレーションした。*10,000* 個の細胞を、共培養実験のために播種した。エレクトロポレーションから *1* 日後、ホタルルシフェラーゼを安定して発現する *10,000* 個の *R a j i* 細胞を、播種した *T H P - 1 M 0* 細胞と *24* 時間共培養した。生存 *R a j i* 標的細胞の定量化を、ホタル発光の検出によって決定した。発光はまた、ガウシアルシフェラーゼをコードする *c i r c R N A* 及び *0 ~ 90 ng* の *d s C i r c R N A* を用いた *T H P - 1 M 0* 細胞のエレクトロポレーションから *24* 時間後または *48* 時間後に上清においても測定した。（図 4 3）。

【 0 4 9 9 】

実施例 5 0

ヒト単球における *C A R* 発現

アナベナイントロン／エクソン領域、及び抗マウス *C D 19* *C A R* 発現配列を含むコンストラクトを環状化した。*C D 3 + T* 細胞を、モックエレクトロポレーションした、または環状 *R N A* でエレクトロポレーションし、*A 20* 標的細胞または *K 462* 非標的細胞と共培養した。特異的溶解を測定した（図 4 4）。

10

20

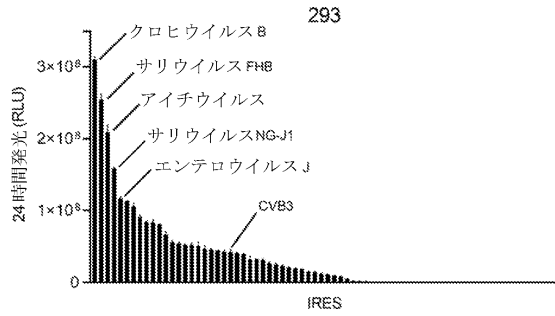
30

40

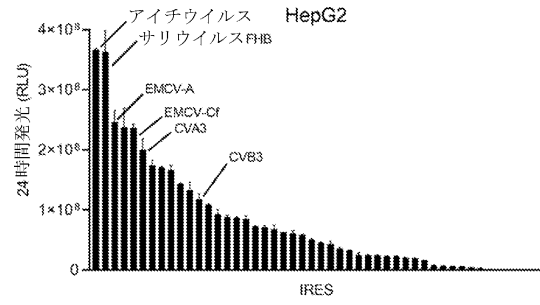
50

【図面】

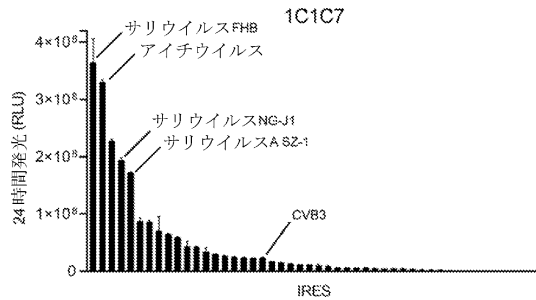
【図 1 A】



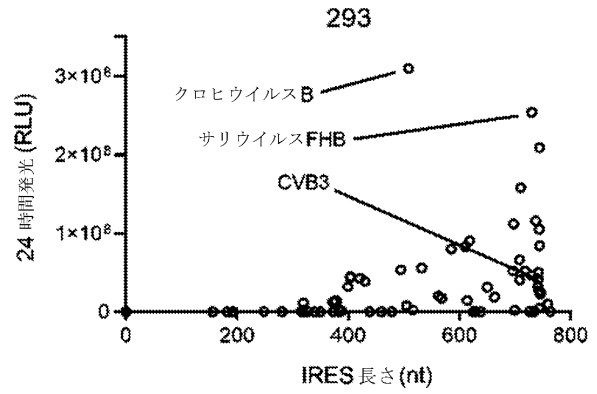
【図 1 B】



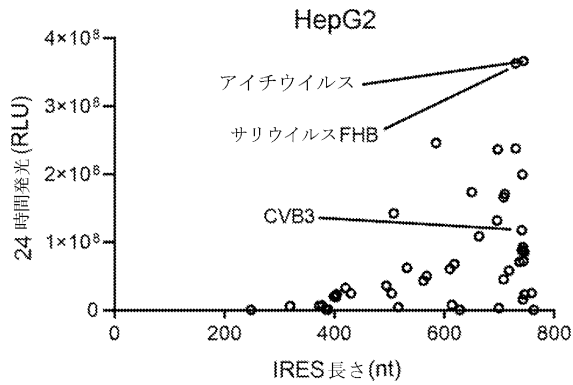
【図 1 C】



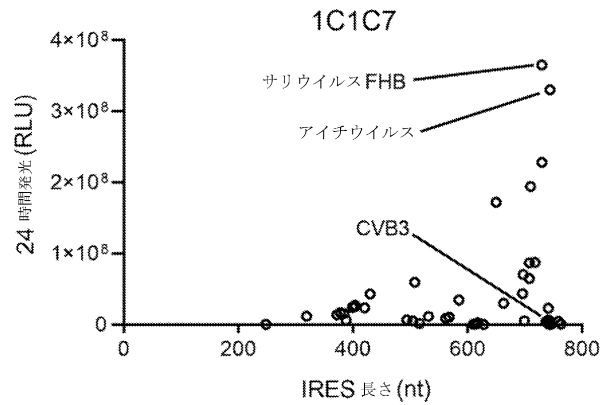
【図 2 A】



【図 2 B】



【図 2 C】



10

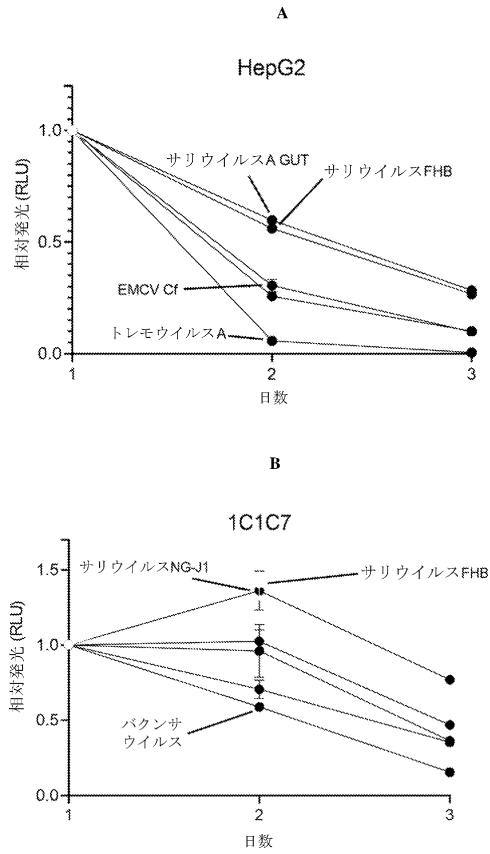
20

30

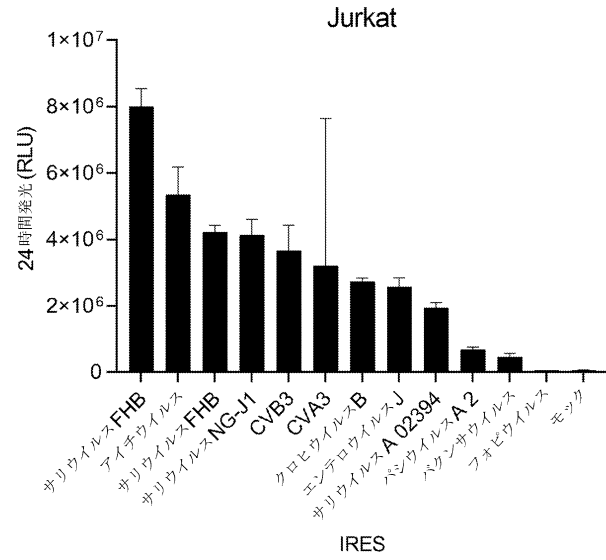
40

50

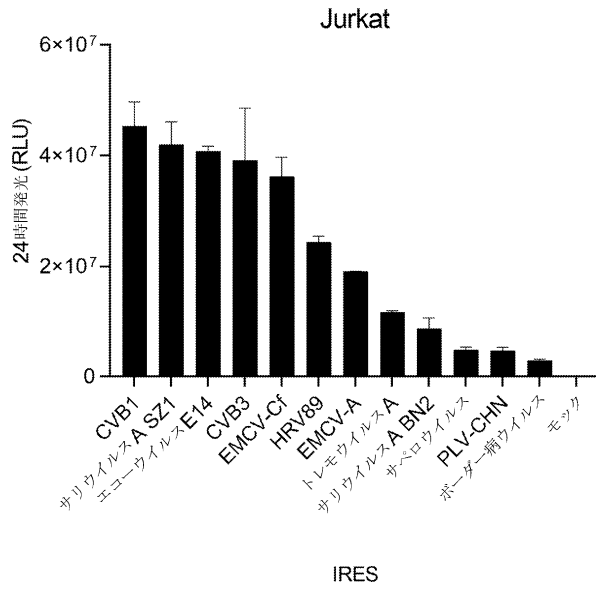
【図 3】



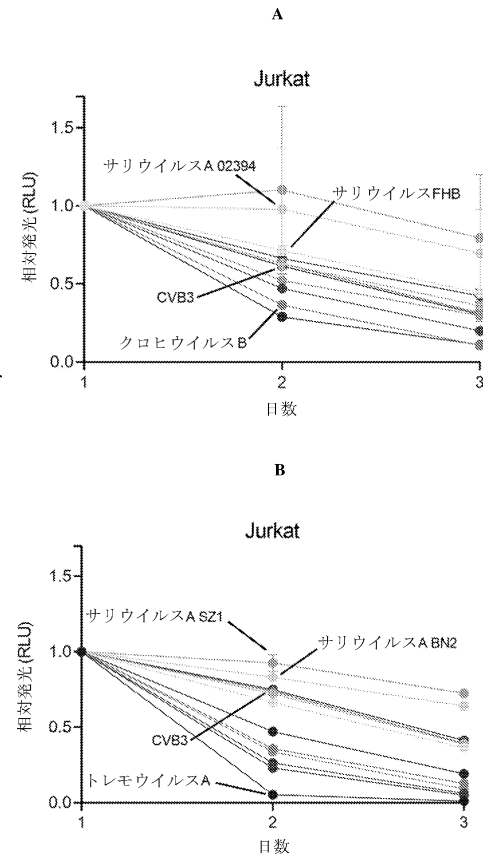
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 5】



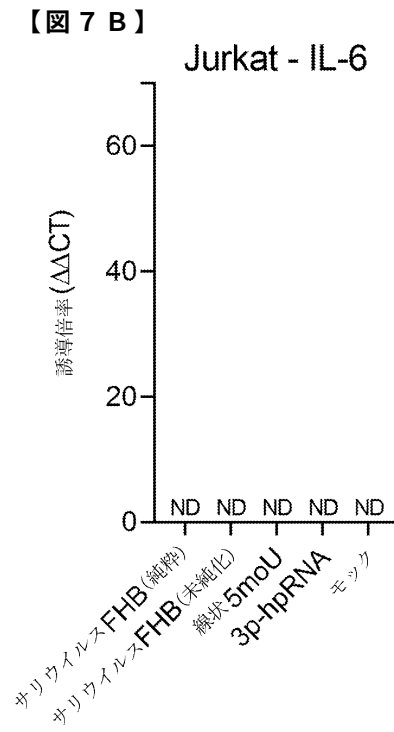
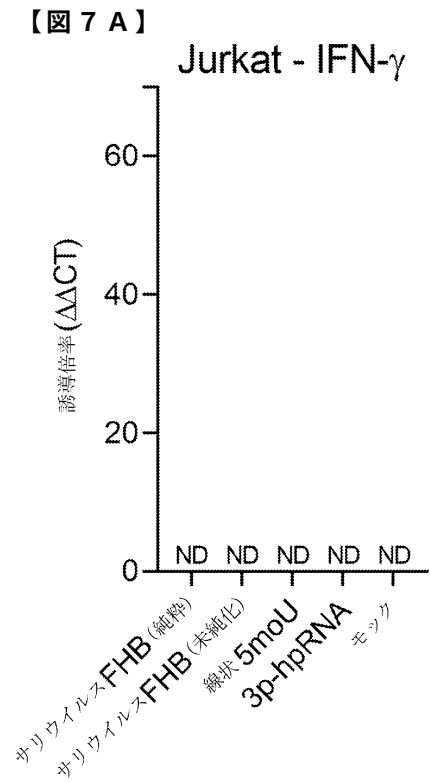
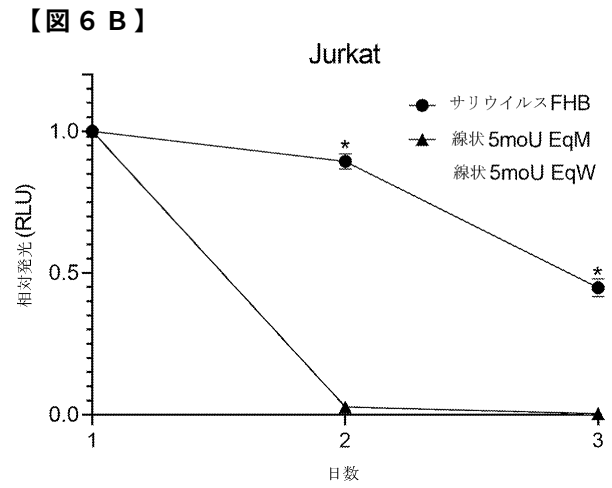
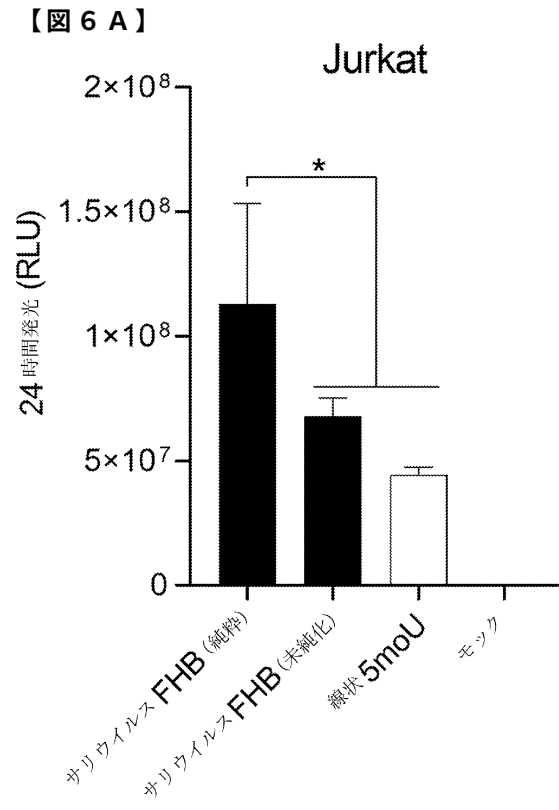
10

20

30

40

50



10

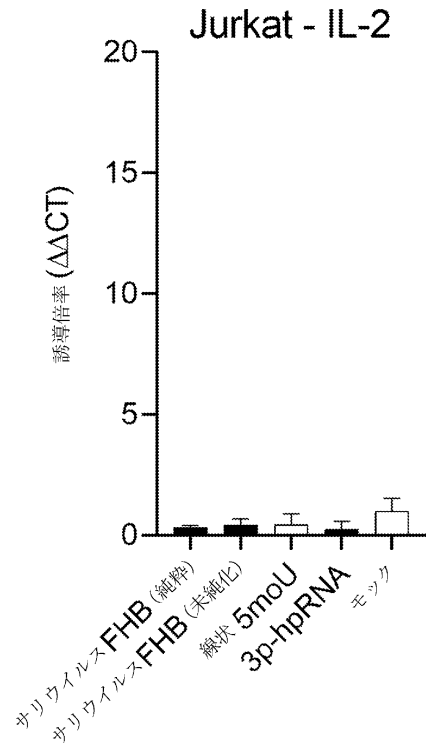
20

30

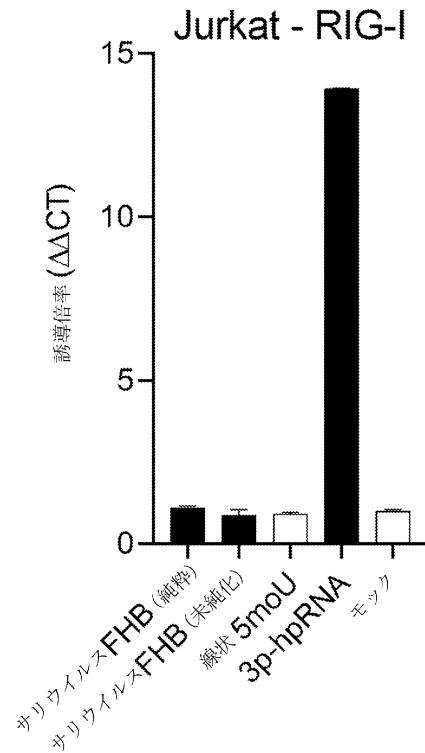
40

50

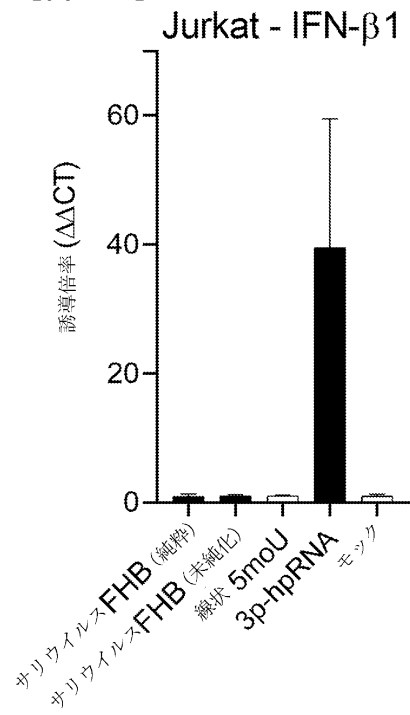
【図 7 C】



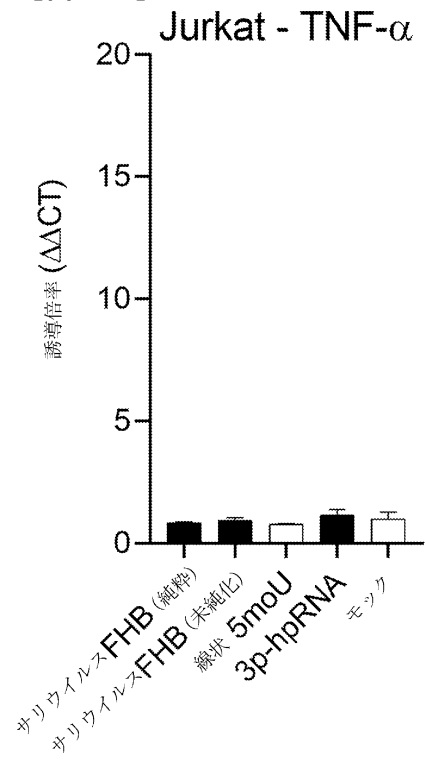
【図 7 D】



【図 7 E】



【図 7 F】



10

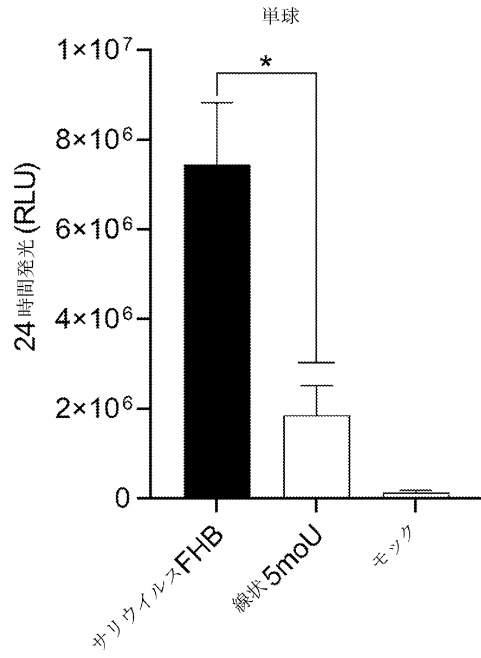
20

30

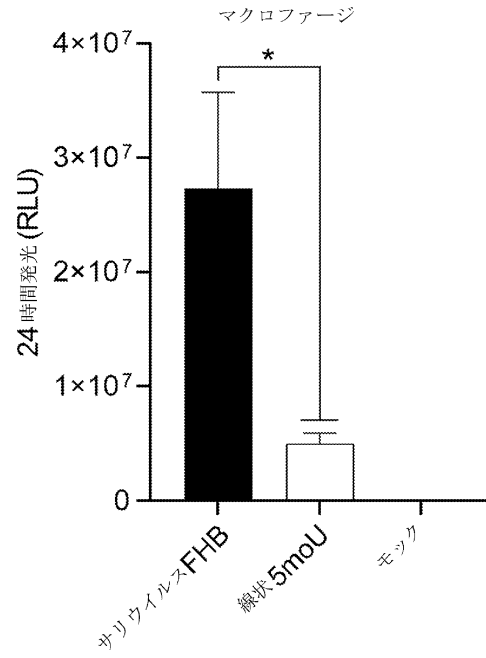
40

50

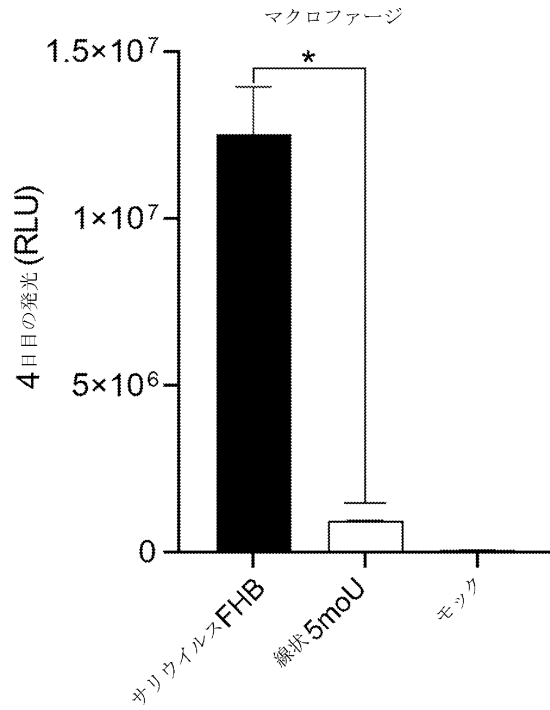
【図 8 A】



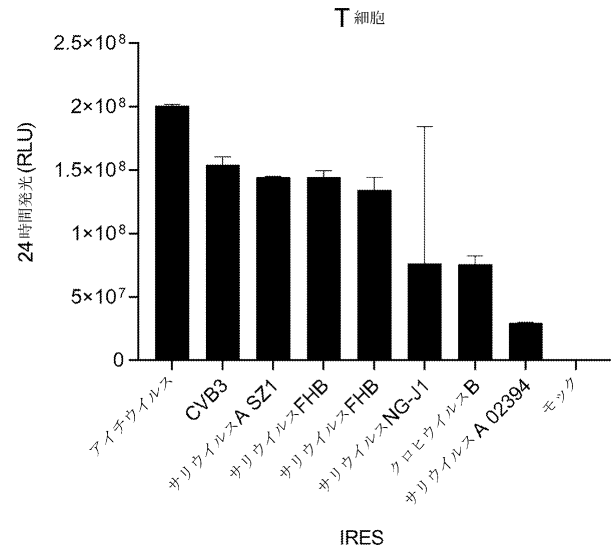
【図 8 B】



【図 8 C】



【図 9 A】



10

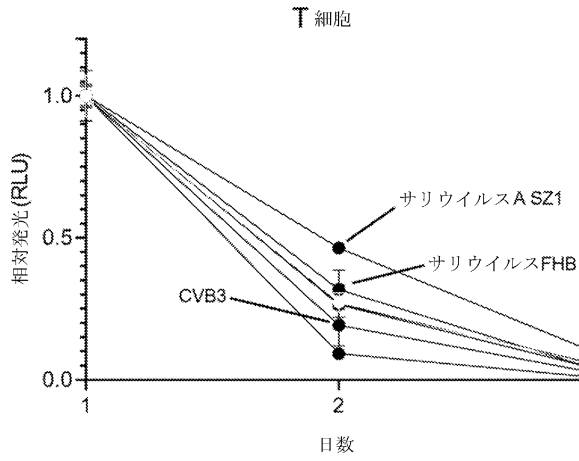
20

30

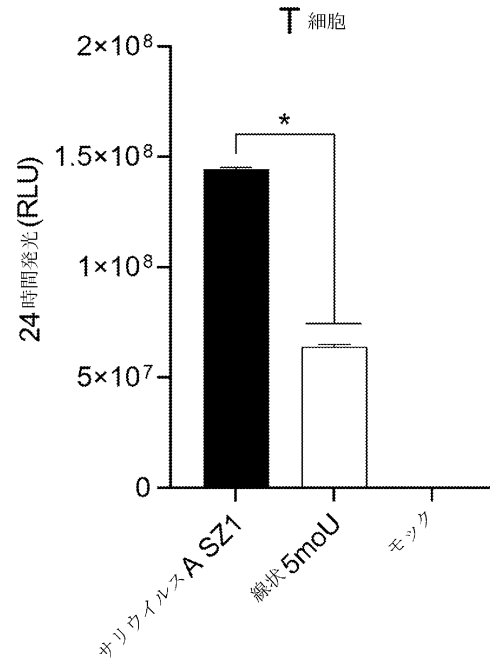
40

50

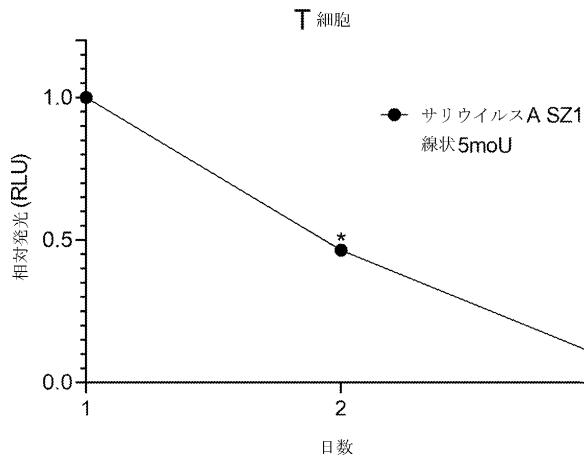
【図 9 B】



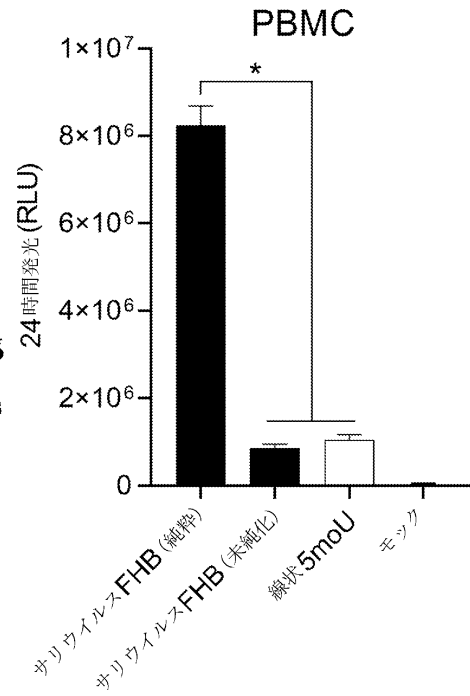
【図 10 A】



【図 10 B】



【図 10 C】



10

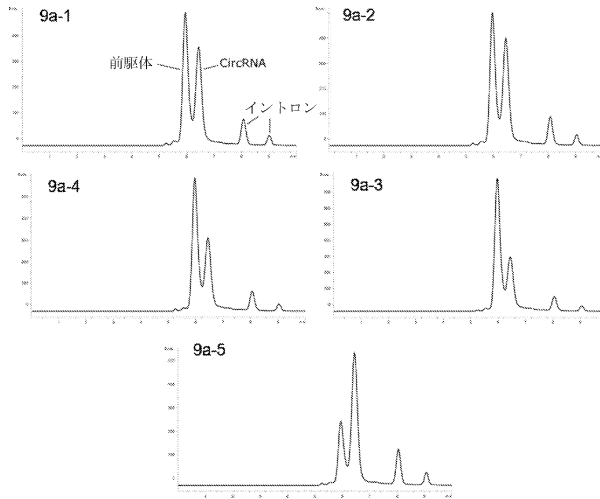
20

30

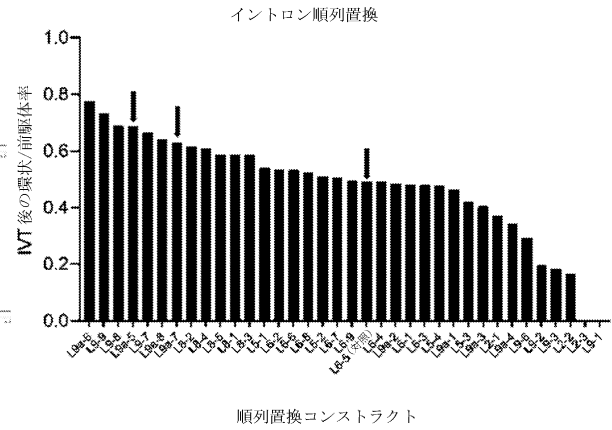
40

50

【図 1 1 A】

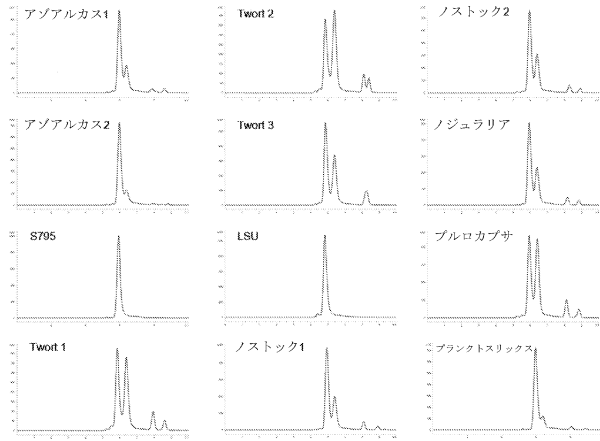


【図 1 1 B】

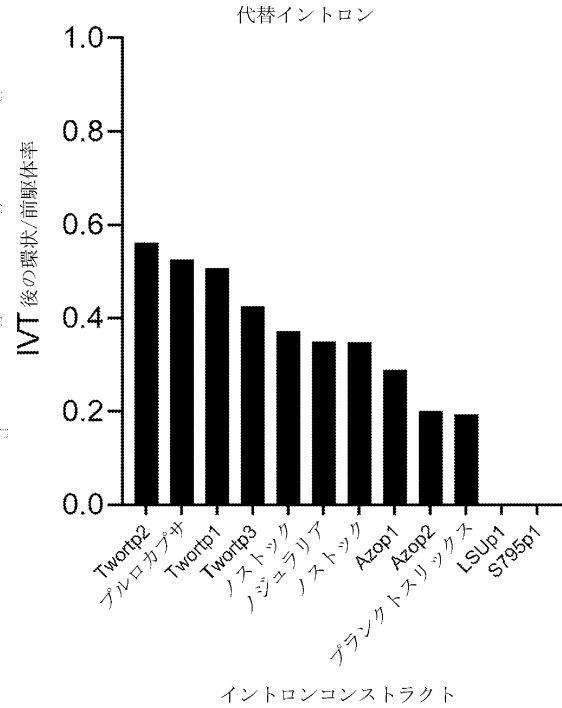


10

【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



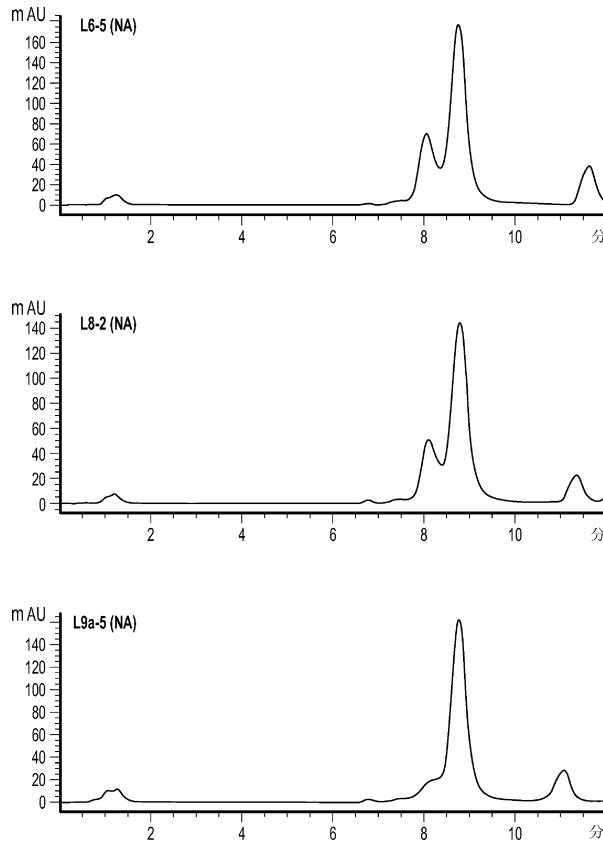
20

30

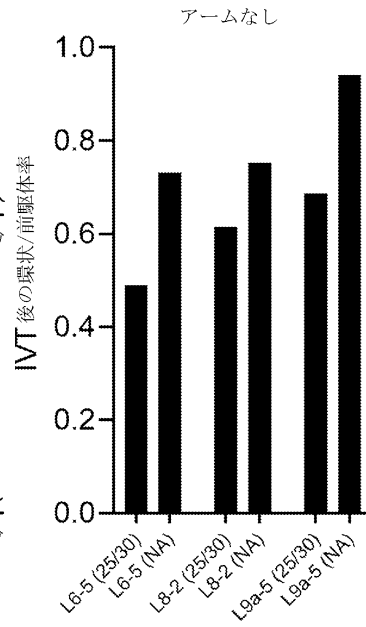
40

50

【図 13 A】



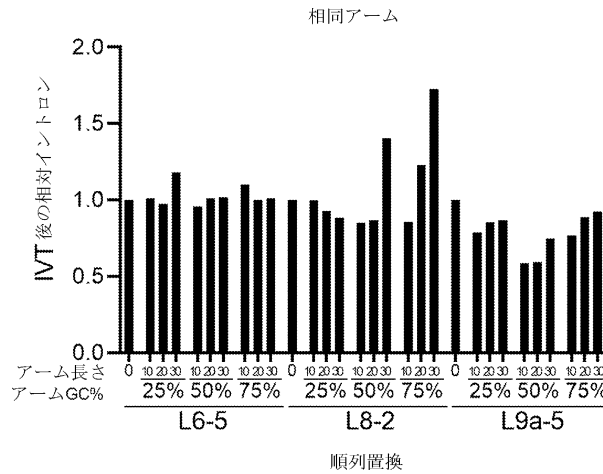
【図 13 B】



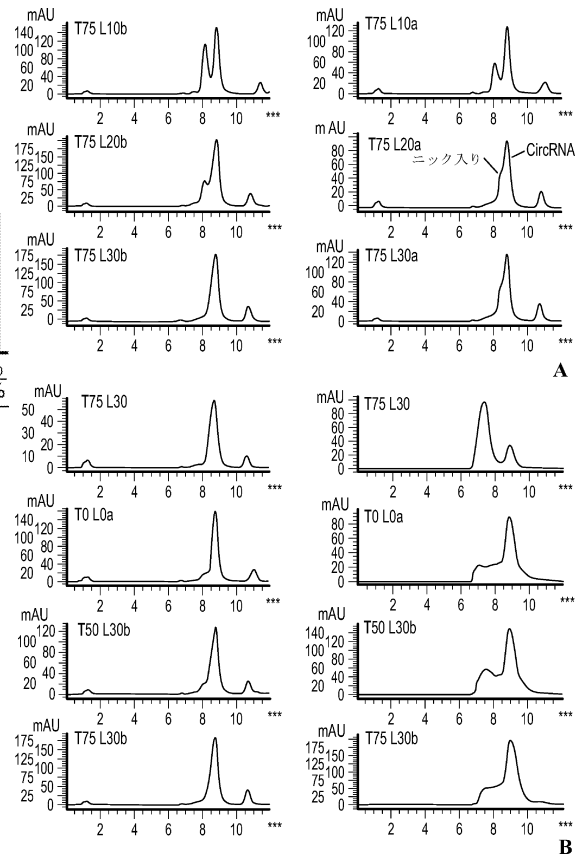
10

20

【図 14】



【図 15】

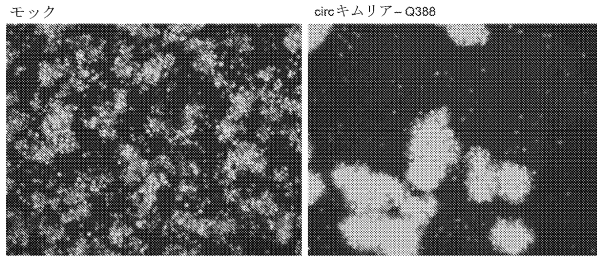


30

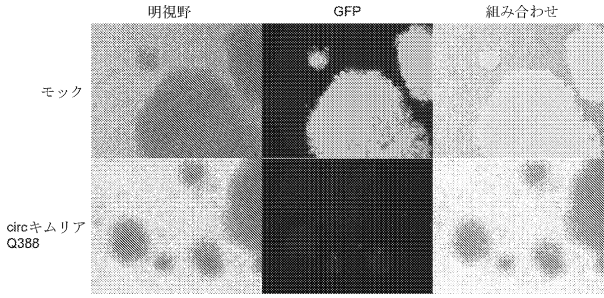
40

50

【図 16】

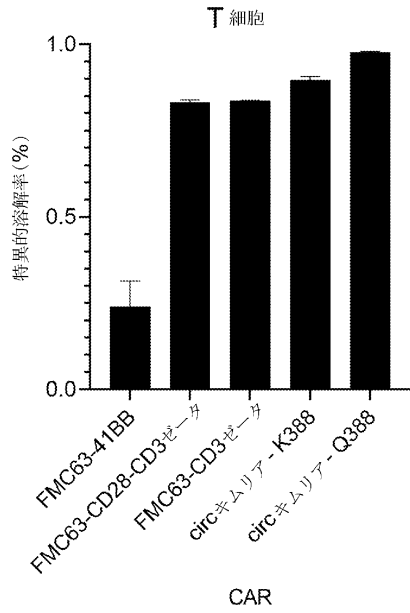


【図 17】

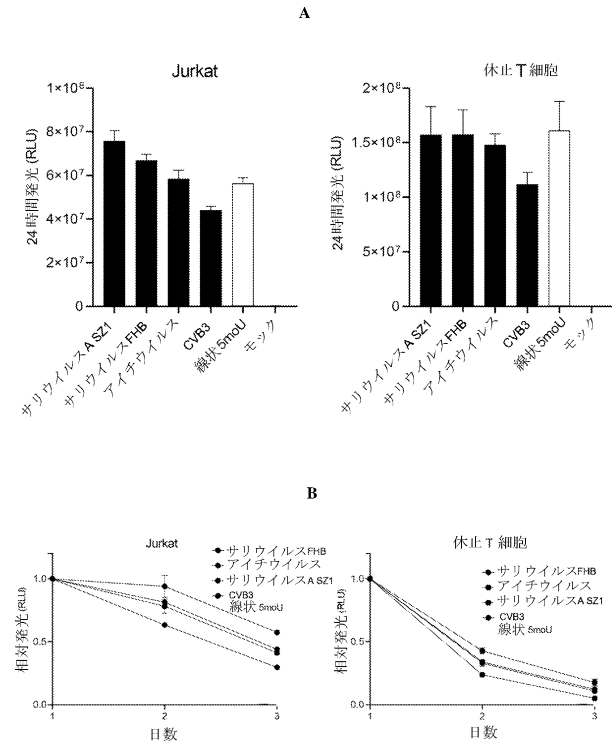


10

【図 18】



【図 19】



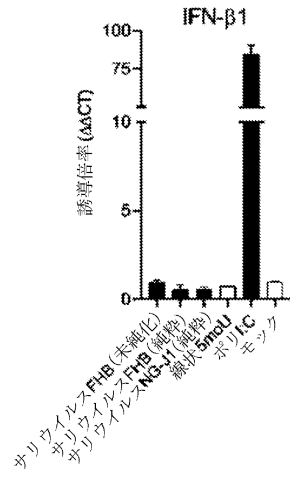
20

30

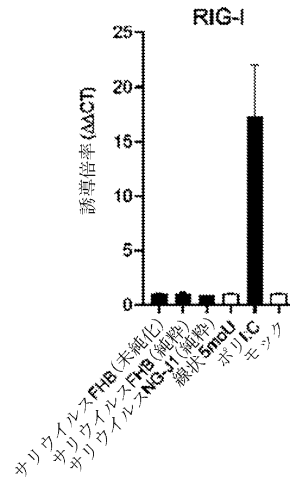
40

50

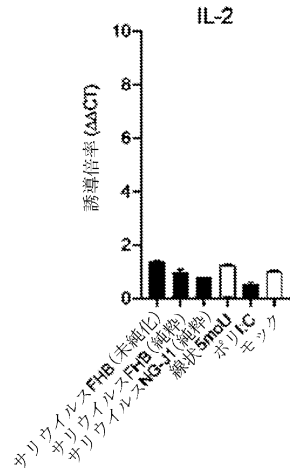
【図 20 A】



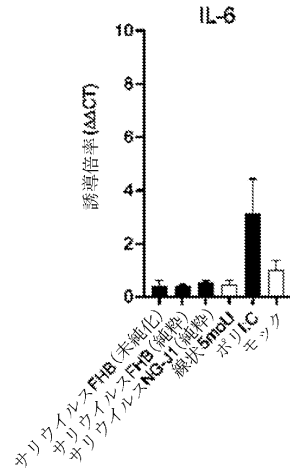
【図 20 B】



【図 20 C】



【図 20 D】



10

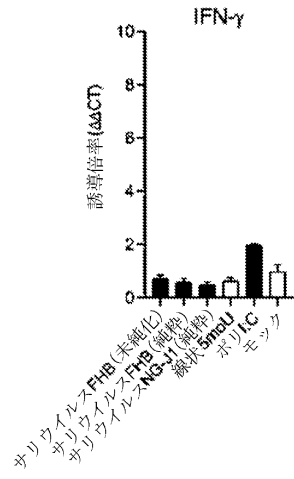
20

30

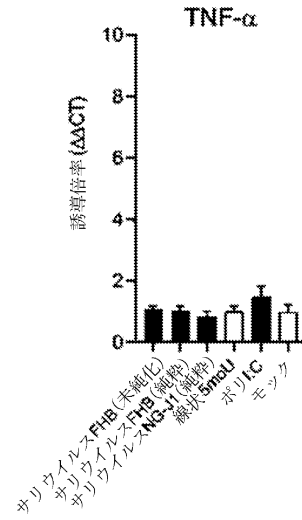
40

50

【図 20 E】

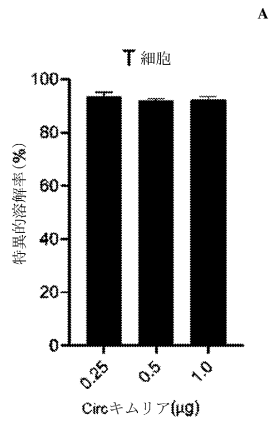


【図 20 F】

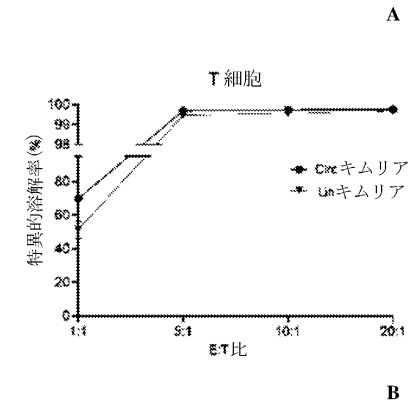


10

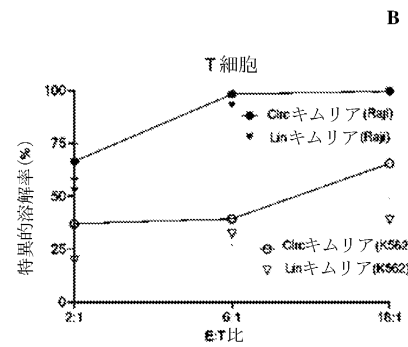
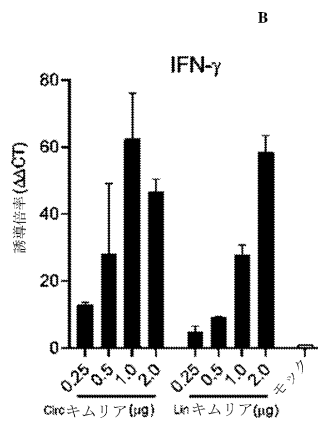
【図 21】



【図 22】



20

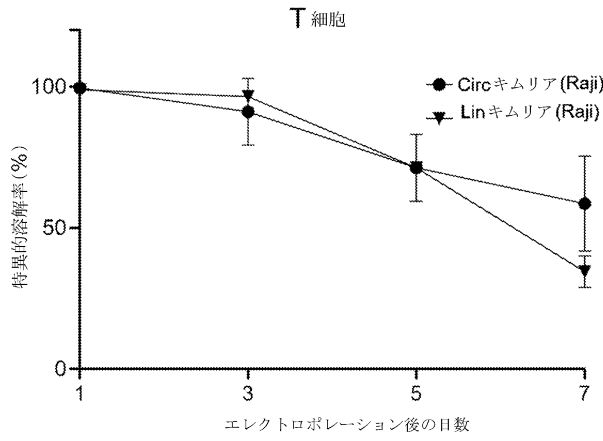


30

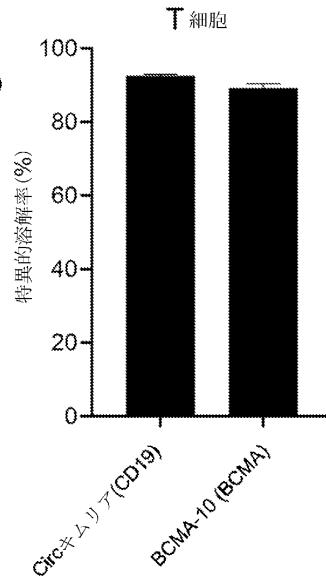
40

50

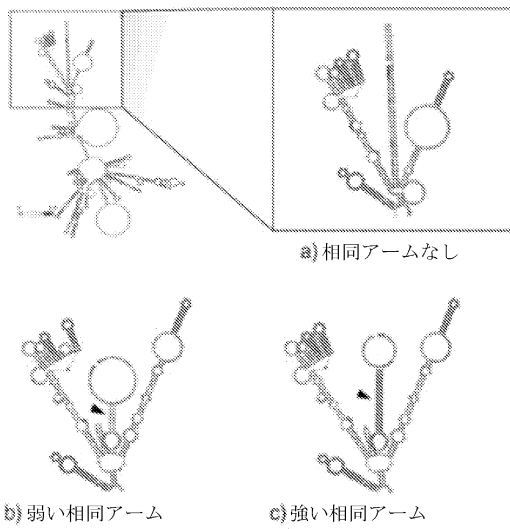
【図 2 3】



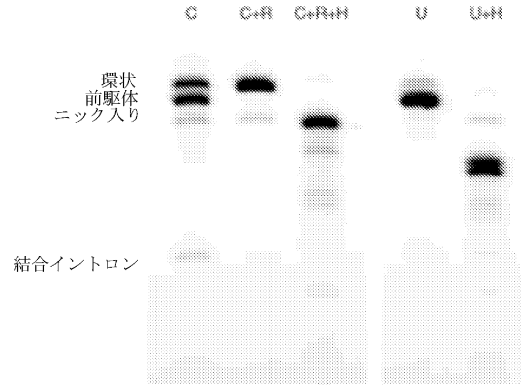
【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】



10

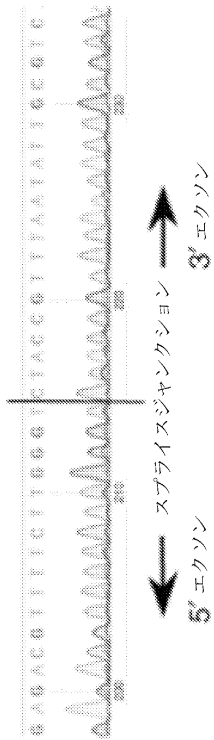
20

30

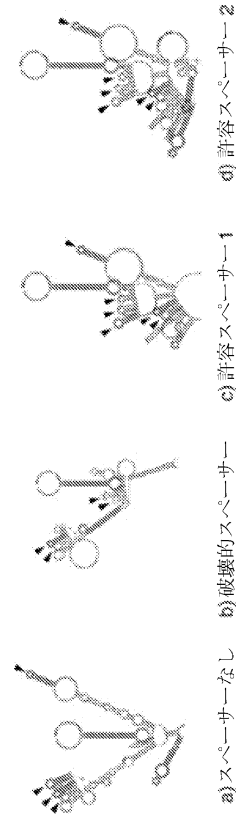
40

50

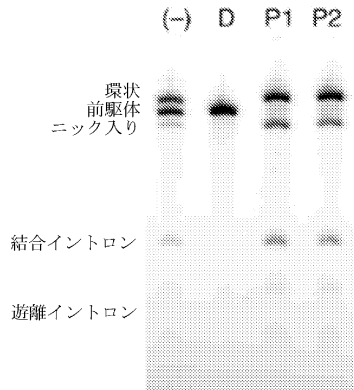
【図 27】



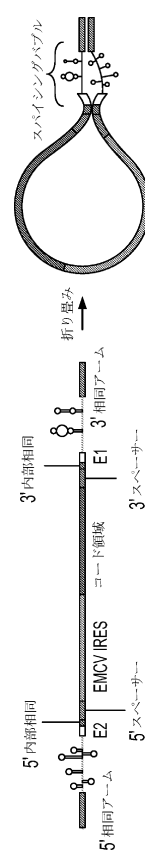
【図 28】



【図 29】



【図 30】



10

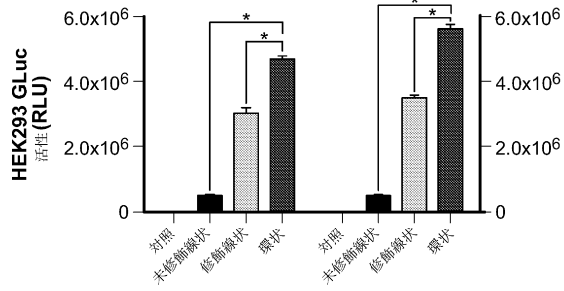
20

30

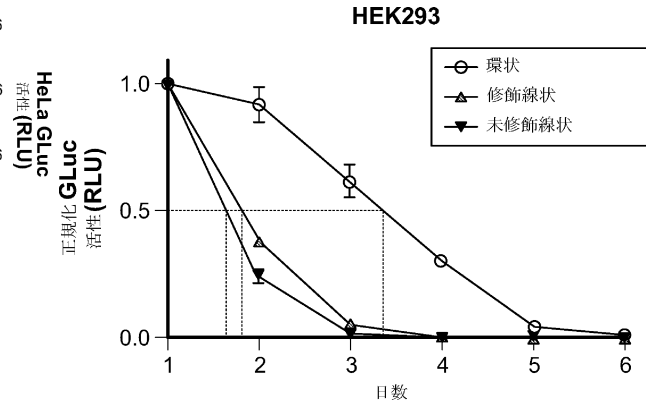
40

50

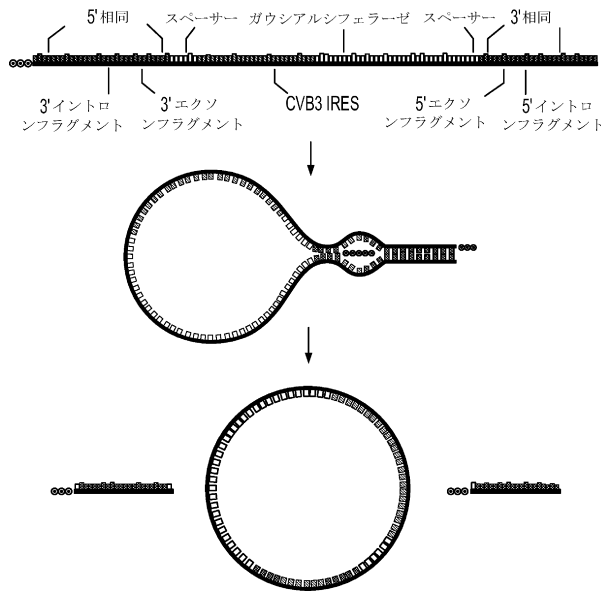
【図 3 1】



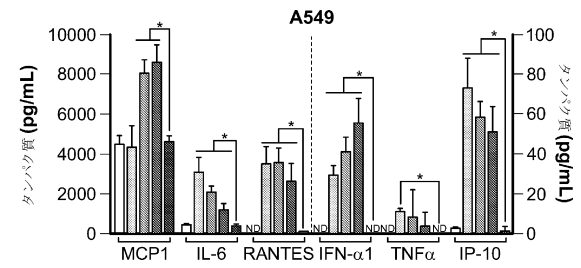
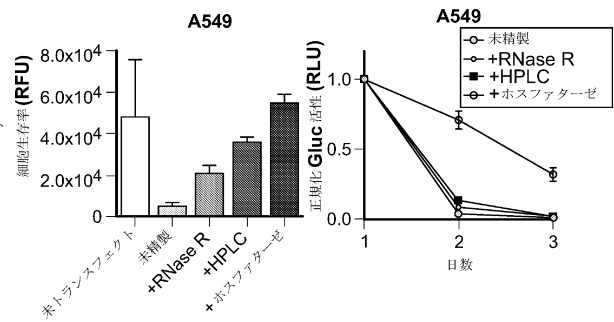
【図 3 2】



【図 3 3】



【図 3 4】



10

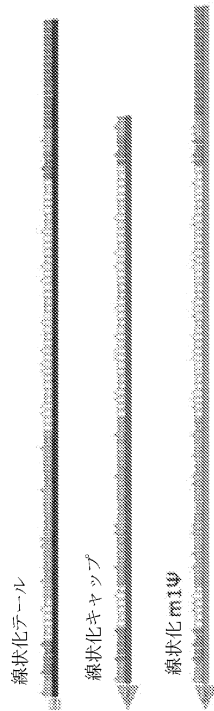
20

30

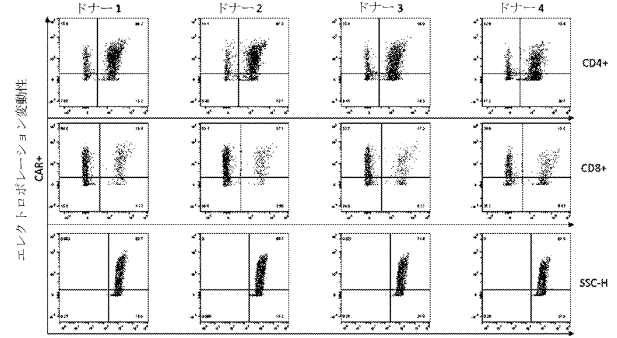
40

50

【図 3 5】



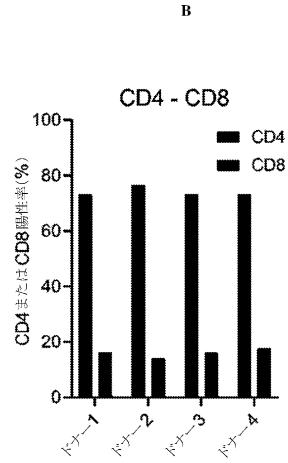
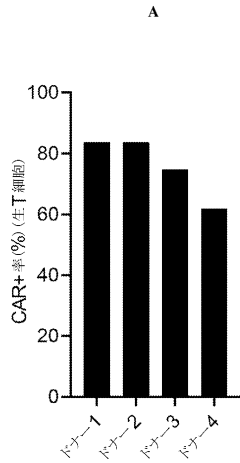
【図 3 6】



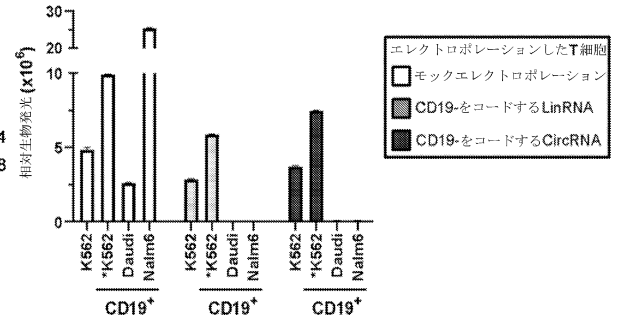
10

20

【図 3 7】



【図 3 8】

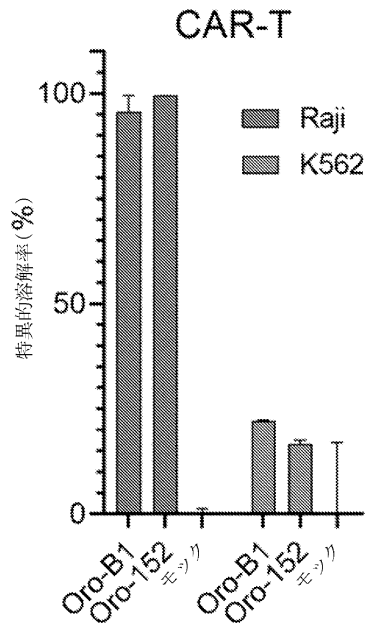


30

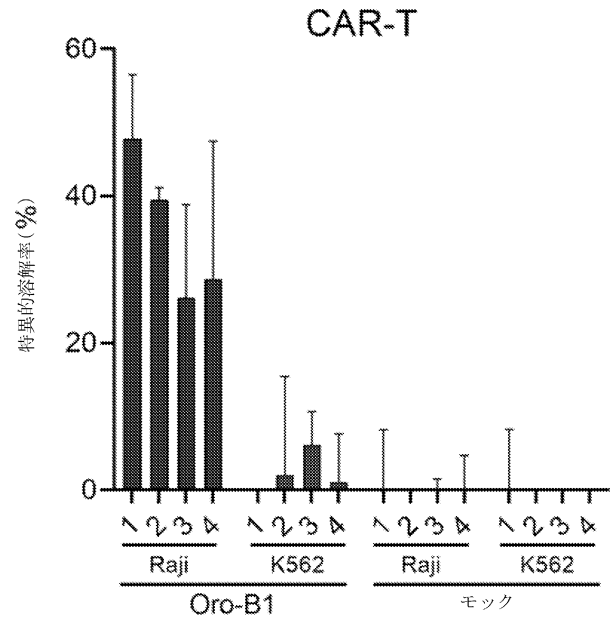
40

50

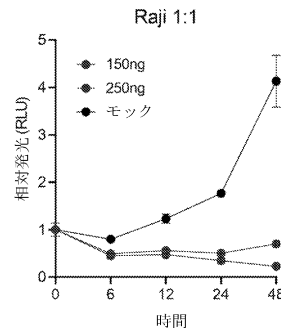
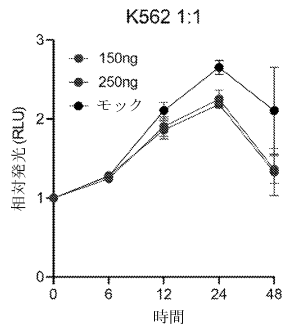
【図 39 A】



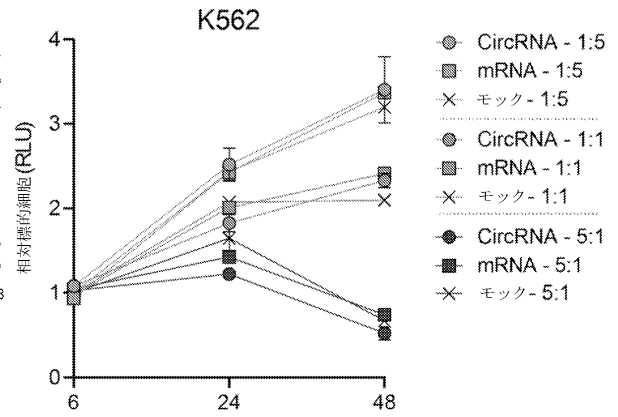
【図 39 B】



【図 40 A】



【図 40 B】



10

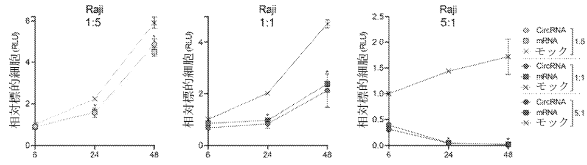
20

30

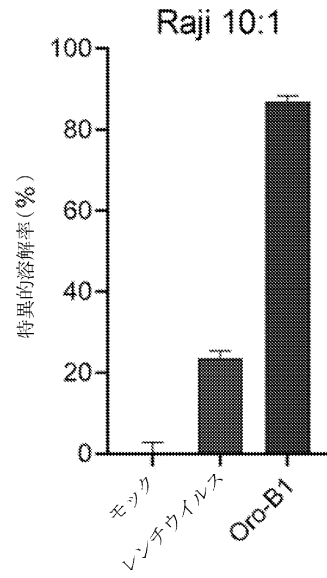
40

50

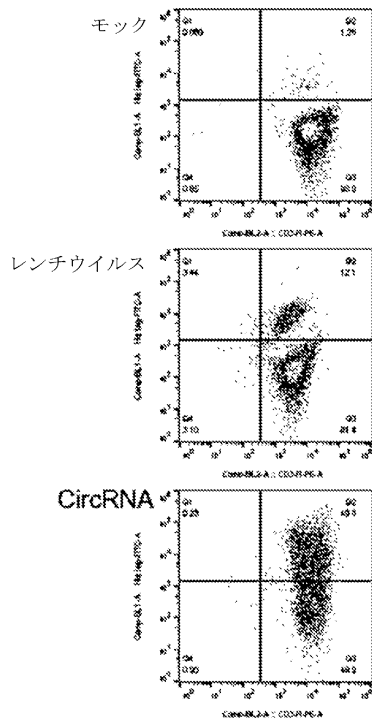
【図 40 C】



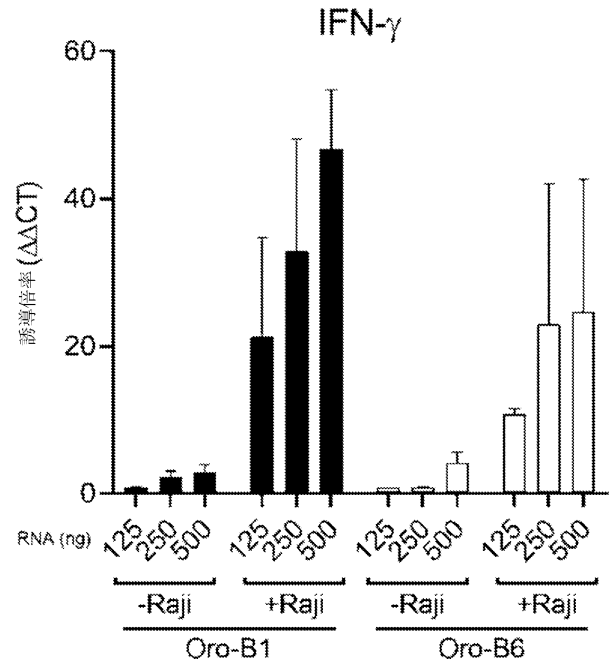
【図 41 A】



【図 41 B】



【図 41 C】



10

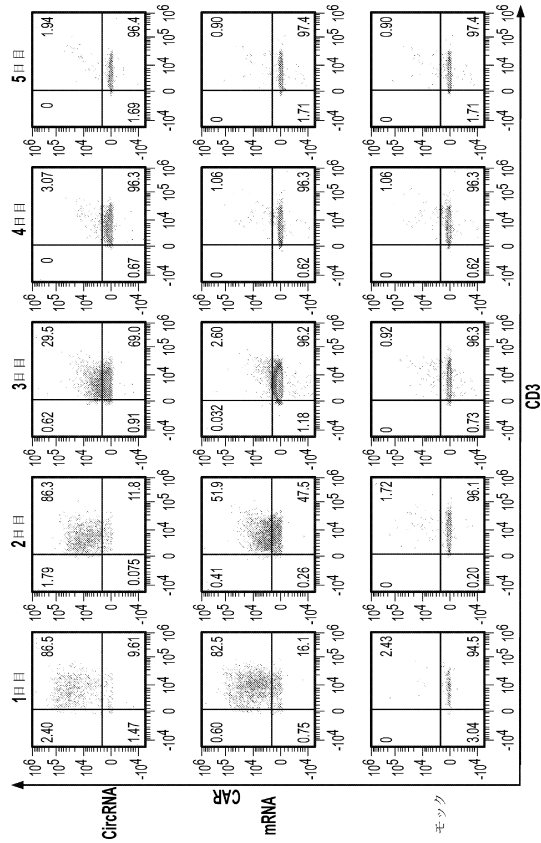
20

30

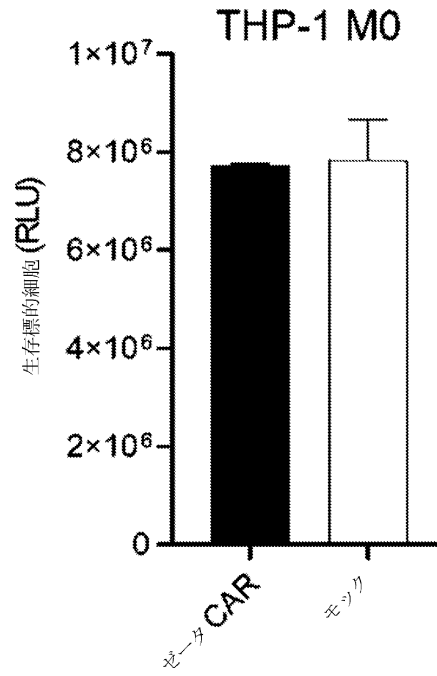
40

50

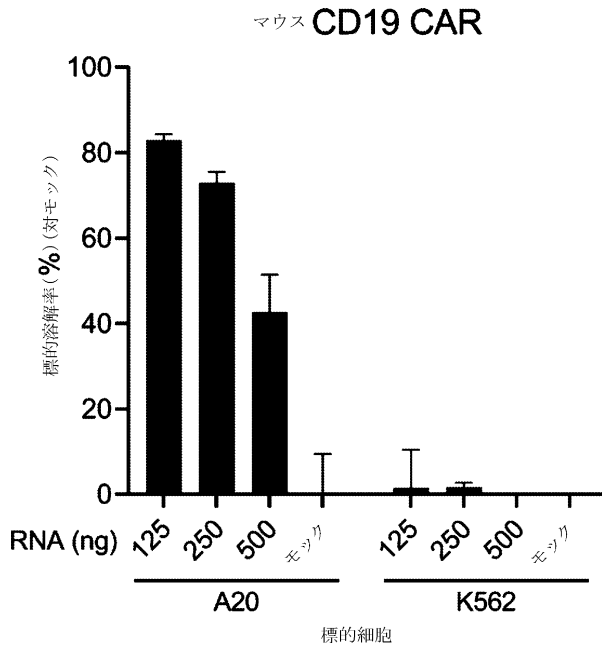
【図 4 2】



【図 4 3】



【図 4 4】



【配列表】

0007686574000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/19 (2006.01)	C 1 2 N	15/19	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18	
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24	
A 6 1 K	47/34 (2017.01)	A 6 1 K	47/34	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 PCT/US2019/035531

(32)優先日 令和1年6月5日(2019.6.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/943,796

(32)優先日 令和1年12月4日(2019.12.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/943,779

(32)優先日 令和1年12月4日(2019.12.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/972,194

(32)優先日 令和2年2月10日(2020.2.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ヴェッセルホーフト ロバート アレキサンダー

- アメリカ合衆国 02142 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ケンダル ストリート 450 オ
ルナ セラピューティクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 アンダーソン ダニエル ジー、
アメリカ合衆国 02142 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ケンダル ストリート 450 オ
ルナ セラピューティクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 フセ シンイチロウ
アメリカ合衆国 02142 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ケンダル ストリート 450 オ
ルナ セラピューティクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 グッドマン ブライアン
アメリカ合衆国 02142 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ケンダル ストリート 450 オ
ルナ セラピューティクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ホーホタ アレン
アメリカ合衆国 02142 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ケンダル ストリート 450 オ
ルナ セラピューティクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 スキロニ ラファエラ
アメリカ合衆国 02142 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ケンダル ストリート 450 オ
ルナ セラピューティクス インコーポレイテッド内
- 審査官 長部 喜幸
- (56)参考文献 国際公開第2018/078053 (WO, A1)
国際公開第2019/089818 (WO, A1)
FOSTER, J.B. et al., Purification of mRNA Encoding Chimeric Antigen Receptor Is Critical for
Generation of a Robust T-Cell Response, HumGene Ther., 2019年02月, 30(2):168-178,
〈DOI:10.1089/hum.2018.145〉
WESSELHOEFT, Alexander et al., RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can
Extend Translation Duration In Vivo Molecular Cell, Molecular Cell, 2019年05月02日, 7
4(3):508-520.e4, 〈DOI:10.1016/j.molcel.2019.02.015〉
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
A61K 48/00
A61K 31/7105
A61K 38/17
A61K 47/18
A61K 47/24
A61K 47/34
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
PubMed